

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Tesis Doctoral

***Papel de GSK-3 y Tau en la
Enfermedad de Huntington***

Marta Fernández Nogales

Madrid

2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Memoria de Investigación presentada por

Marta Fernández Nogales

Licenciada en Biología

Para optar al grado de

Doctora en Ciencias

Por la Universidad Autónoma de Madrid

Papel de GSK-3 y Tau en la Enfermedad de Huntington

Trabajo dirigido por el

Dr. José Javier Lucas Lozano

Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

*La presente tesis ha sido realizada en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
(CSIC-UAM)*

*El laboratorio del Dr. Lucas también forma parte del Centro de Investigación Biomédica
en Red para Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)*



*Si perdemos el sentido del misterio,
la vida no es más que una vela apagada.*

Agradecimientos

Y llegó el momento....Han pasado casi seis años desde que este viaje comenzó y sólo puedo decir gracias.

En primer lugar quiero agradecerse a mi director de tesis José Lucas, que ha sabido guiarme para sacar lo mejor de mí. Esto ha sido un regalo en mi vida. Han sido años de grandes experiencias y ha conseguido que se me acelere el corazón cada vez que veo el resultado de un experimento ya que me ha contagiado su pasión por la ciencia. Cierro esta etapa sólo con grandes recuerdos.

También se lo agradezco a mis compañeros de labo, el 209, por tantos buenos momentos y risas que hemos compartido, cuando pienso en vosotros no paran de brotarme en la cabeza momentos y solo de pensarlo se me escapa una sonrisa. Esta tesis no hubiera sido igual sin vosotros. A Parras, mi compañero de tesis y mi gran amigo, con el que más tiempo he compartido y que siempre ha estado en los buenos y malos momentos, y que con sus gracias nos ha alegrado el día a día en el labo. A Miriam, que más buena no se puede ser. A JR que nos está dando un ambientillo al labo jj... A María que siempre está dispuesta a ayudar y a Ivó por aguantarnos con tanta paciencia. También se lo quiero agradecer a los que han pasado por el labo y ya no están, a Rachel y a Cristina porque fueron las primeras que me recibieron a mi llegada y me enseñaron tantas cosas. A Ali y a Desi por su ayuda.

Y porque el CBM está llena de gente maja también se lo quiero agradecer a todos esos amigos con los que he compartido experimentos, charlas y reuniones pasilleras improvisadas, que no han dudado en ayudarme cuando lo he necesitado y que siempre han compartido mis alegrías. En primer lugar a los vecinos del laboratorio, al 208, que siempre están ahí cuando nos falta algo y dispuestos a ayudar: Félix, Jesús, Jero, Almu, Raquel, Patri, María y Noe. A los balbinos: Aldo, porque vales mucho (ojalá hubiera más gente por el mundo como tú), Irene, Pilar, Elena, Enrique y Ana, con las cuales he compartido muchos momentos y que siempre han estado ahí. Al 227, Carlos, que tantas conversaciones hemos tenido y dudas me has resuelto. Adri, tan majo. Al 122, Stefano, Azu, Enrique y Ernest siempre tan agradables. Al Peluki que tiene un corazón gigante...A Manu, a Curro, a Ali, a Patri y a toda esa gente que puede que me esté dejando pero que han estado ahí.

No me puedo olvidar de mis amigos de Xeraco, Jony, Leti, Rosa, Sara, Borja, Juanma, Edu, Carolina, Héctor y Rober que más que amigos somos hermanos, que nos hemos criado juntos y aunque cada uno tengamos nuestras vidas, verano tras verano hacemos lo posible por liarla un poquito. Porque siempre se han interesado por mi tesis y sé que siempre estarán ahí.

A mis mejores amigas que siempre están en los momentos de desesperación, Lidia que desde el cole hemos seguido los mismos pasos y ahí seguimos y siempre

seguiremos y, a Alejandra, que tanto estamos compartiendo y que de vez en cuando me recuerda que “la vida es un baile de ilusiones y el que no baile está muerto”.

No me puedo olvidar de mi familia por apoyarme en el paso de venirme a Madrid para hacer esta tesis y echarme tanto de menos y aguantar tantas cosas. En especial a mi madre que tanto me cuida, a mi padre que siempre está para cualquier cosa que le pida, a mi hermana Mireia que tanto nos echamos de menos (menos mal que está Guti), a mi iaia Julia y a mis tíos, Cari y Marcia que tanto me han apoyado.

Por último, se lo agradezco a Miguel por aparecer en mi vida e insistir para no irse de ella, porque nunca ha dudado en acompañarme al fin del mundo y sabe sacarme una sonrisa en cualquier momento.

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS.....	17
II.	RESUMEN/SUMMARY	23
III.	INTRODUCCIÓN	29
1.	LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	31
1.1.	Descripción general de la Enfermedad de Huntington	31
1.1.1.	Descripción inicial	31
1.1.2.	Síntomas	31
1.1.3.	Neuropatología	32
1.2.	La mutación.....	34
1.3.	Función normal de la Huntingtina	35
1.4.	Mecanismos patogénicos de la Enfermedad de Huntington	36
1.4.1.	Pérdida de la función de la Huntingtina normal	36
1.4.2.	Toxicidad de la proteína.....	37
	<i>Alteración de rutas de señalización y quinasas</i>	<i>37</i>
1.4.3.	Toxicidad del ARN - Enfermedades causadas por expansión de la secuencia CAG	39
2.	GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 (GSK-3)	41
2.1.	Descripción.....	41
2.2.	Mecanismos de regulación de la actividad GSK-3	41
2.2.1.	Fosforilación.....	41
2.2.2.	Formación de complejos.....	42
2.2.3.	Localización subcelular.	43
2.3.	Funciones de GSK-3.	43
2.4.	Implicaciones de GSK-3 en la etiología de diversas enfermedades.	44
2.5.	Potencial terapéutico de los inhibidores de GSK-3.	45
2.6.	GSK-3 y Enfermedad de Huntington.	46
3.	Tau.....	47
3.1.	Descripción.....	47
3.2.	Gen que codifica la proteína Tau.	48
3.3.	Tauopatías.	49
3.4.	Alteración del <i>splicing</i> alternativo y neurodegeneración.	51
IV.	OBJETIVOS.....	53
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	57

1. MUESTRAS DE TEJIDO CEREBRAL.....	59
1.1. Muestras de pacientes.....	59
1.2. Modelos de animales utilizados	61
1.2.1. Modelo transgénico de la Enfermedad de Huntington R6/1.....	61
1.2.2. Modelo transgénico condicional de la Enfermedad de Huntington HD94	61
1.2.3. Modelo transgénico de sobreexpresión de GSK-3	62
1.2.4. Modelo knock-out de Tau	63
1.3. Genotipado de los animales.....	63
1.3.1. Obtención de ADN genómico.....	63
1.3.2. Amplificación de ADN genómico y genotipado	63
2. TÉCNICAS EMPLEADAS	65
2.1. Análisis de nivel ARN mediante RT-PCR cuantitativa.....	65
2.1.1. RT-PCR relativa	65
2.1.2. RT-PCR absoluta	65
2.1.3. Oligonucleótidos utilizados.....	66
2.2. Análisis del nivel de proteína mediante electrotransferencia e inmunodetección (Western blot)	67
2.3. Ensayo de actividad enzimática GSK-3.....	67
2.4. Análisis histológico de los tejidos	68
2.4.1. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	68
2.4.2. Microscopía electrónica.....	69
2.5. Cultivo celular	69
2.6. Extracción de la fracción insoluble en Sarkosyl	70
2.7. Coimmunoprecipitación	70
2.8. Cuantificación estereológica del volumen cerebral y de los agregados de Huntingtina.....	71
2.9. Anticuerpos utilizados	71
3. ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DEL FENOTIPO DE LOS RATONES.....	72
3.1. Peso Corporal.....	72
3.2. Test de campo abierto (<i>Open Field Locomotion</i>)	72
3.3. Rotarod.....	72
3.4. Test de condicionamiento aversivo (<i>Contextual Fear conditioning</i>)	73
4. ANÁLISIS DE DATOS	73

VI.	RESULTADOS	75
1.	ANÁLISIS DEL NIVEL Y LA ACTIVIDAD DE GSK-3 EN EL CEREBRO DE PACIENTES Y EN UN MODELO DE RATÓN DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	77
1.1.	Disminución del nivel y de la actividad GSK-3 en cerebro de pacientes de la EH...	77
1.2.	Disminución del nivel y de la actividad de GSK-3 en el cerebro del ratón modelo de la EH R6/1.....	79
2.	GENERACIÓN DE RATÓN DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON CON EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DE GSK-3 PARA CORREGIR LA DISMINUCIÓN DE GSK-3 ENDÓGENA	81
3.	ANÁLISIS DEL EFECTO DE MODIFICAR GENÉTICAMENTE GSK-3 EN RATONES MODELO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....	85
3.1.	La sobreexpresión moderada de GSK-3 atenúa la atrofia cerebral en los R6/1	85
3.2.	La expresión moderada de GSK-3 transgénica atenúa los déficits motores y cognitivos de los ratones R6/1	86
4.	ANÁLISIS DEL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DEL SUSTRATO DE GSK-3, TAU, EN CEREBRO DEL RATÓN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	89
5.	ANÁLISIS DEL SUSTRATO DE GSK-3, TAU, EN CEREBRO DE PACIENTES Y RATÓN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON.....	90
5.1.	Incremento del nivel de Tau total y alteración del ratio de sus isoformas en pacientes de la Enfermedad de Huntington	90
5.2.	Descripción de una nueva marca histopatológica de Tau en pacientes de la Enfermedad de Huntington.....	94
5.2.1.	Análisis de la posible presencia de TNRs en otras enfermedades causadas por expansiones CAG.....	101
5.3.	El factor de <i>splicing</i> SRSF6 que regula el exón 10 de Tau está alterado en la Enfermedad de Huntington	102
5.4.	Alteración de SRSF6, desbalance del ratio de isoformas de Tau, incremento del nivel de Tau total y, detección de TNRs en el ratón modelo de la Enfermedad de Huntington	104
6.	ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA REDUCCIÓN GENÉTICA DE TAU EN EL MODELO DE RATÓN DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON R6/1	107
VII.	DISCUSIÓN.....	113
VIII.	CONCLUSIONES	123

IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	127
X.	ANEXO.....	143

ABREVIATURAS

A: *adenine* / adenina
A β : *amyloid β -peptide* / péptido β -amiloide
ADN: *deoxyribonucleic acid* / ácido desoxirribonucleico
APP: *amyloid precursor protein* / proteína precursora de amiloide
AR: *androgen receptor* / receptor de andrógenos
ARNm: *messenger ribonucleic acid* / ácido ribonucleico mensajero
ATN1: *atrophin 1* / atrofina 1
ATP: *adenosine triphosphate* / adenosina trifosfato
ATXN: *ataxin* / ataxina
 β -Gal: *β -Galactosidase* / β -Galactosidasa
BCL-2: *B-cell lymphoma 2* / linfoma 2 de células-B
BDNF: *brain derived neurotrophic factor* / factor neurotrófico derivado de cerebro
BSA: *bovine serum albumin* / seroalbúmina bovina
C: *cytosine* / citosina
CACNA1A: *α -1A subunit voltage-dependent calcium channel* / subunidad α -1A del canal de calcio dependiente de la voltaje
CamK: *calcium/calmodulin-dependent protein kinase* / proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina
CBD: *corticobasal degeneration* / degeneración corticobasal
CDK-5: *cyclin- dependent kinase 5* / quinasa dependiente de ciclina 5
CREB: *cAMP response element-binding protein* / proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc
Cx: *cortex* / corteza
D1: *dopamine receptor type-1* / receptor de dopamina tipo 1
D2: *dopamine receptor type-2* / receptor de dopamina tipo 2
DAB: *diaminobenzidine* / diaminobencidina
DARPP32: *dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein* / fosfoproteína neuronal regulada por dopamina y AMPc
DM1: *myotonic dystrophy* / distrofia miotónica
DMS: *minimum squares difference* / diferencia por mínimos cuadrados
DMSO: *dimethyl sulfoxide* / dimetil sulfóxido
DRPLA: *dentatorubral-pallidoluysian atrophy* / atrofia dentatorubropalidoluisiana
DTT: *dithiothreitol* / ditiotreitól
EA: *Alzheimer's Disease* / Enfermedad de Alzheimer
ECL: *enhanced chemiluminiscent* / sustrato quimioluminiscente
EDTA: *ethylenediaminetetracetic acid* / ácido etildiaminotetracético
EGTA: *ethyleneglycoltetracetic acid* / ácido etilenglicoltetracético
EH/HD: *Huntington's Disease* / Enfermedad de Huntington
EIF2 β : *eukaryotic initiation factor 2B* / factor de iniciación eucariótico 2B
ERK: *extracellular signal regulated kinase* / quinasa regulada por señal extracelular
ES: *standard error* / error estándar
FBS: *fructose 1,6-bisphosphatase* / fructosa 1,6-bisfosfatasa
FTD: *frontotemporal dementia* / demencia frontotemporal
FTDP-17: *frontotemporal dementia with parkinsonism associated to chromosome 17* / demencia frontotemporal con parkinsonismo asociado al cromosoma 17
G: *guanine* / guanina
GPe: *globo pálido externo*
GPI: *globo pálido interno*
GSK-3: *glycogen synthase kinase 3* / glucógeno sintasa quinasa 3
GFP: *green fluorescent protein* / proteína verde fluorescente
HAP40: *huntingtin associated protein of 40 KDa* / proteína de asociación a huntingtina de 40 KDa

HDAC: *histone deacetylase* / histona deacetilasa
HDL-2: *Huntington's Disease like 2* / Enfermedad de Huntington tipo 2
HEPES: *N-(2-hydroxyetil)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)* / N-(2-hidroxietil)-piperacina-N'-(2-ácido etanolsulfónico)
Hipp: *hippocampus* / hipocampo
HSP1: *heat shock protein-1* / proteína de choque térmico 1
Htt: *huntingtin* / huntingtina
IBs: *inclusion bodies* / cuerpos de inclusión
IF: *immunofluorescence* / inmunofluorescencia
IHQ: *immunohistochemistry* / inmunohistoquímica
IINs: *intranuclear neuronal inclusions* / inclusiones intranucleares neuronales
IP3: *inositol triphosphate* / Inositol trifosfato
IPPasa: *inositol polyphosphate 1-phosphatase* / inositol polifosfato 1 fosfatasa
IPM: *post-mortem interval* / interval post-mortem
JNK: *c-Jun N-terminal kinase* / quinasa c-Jun N-terminal
JPH3: *junctophilin-3* / juntofilina 3
KDa: kilodalton
MAP: *microtubule associated protein* / proteína asociada a microtúbulos
MEK: *MAP kinase kinase* / MAP quinasa quinasa
mHtt: *mutant huntingtin* / huntingtina mutada
MSSNs: *medium size spiny neurons* / neuronas espinosas de tamaño medio
MTOC: *microtubule-organizing center* / centro organizador de microtúbulos
NES: *nuclear export signal* / señal de exportación nuclear
NFAT: *nuclear factor of activated T cells* / factor nuclear de células T activadas
NLS: *nuclear localization signal* / señal de localización nuclear
P: *phosphate* / fosfato
PBS: *phosphate buffered saline* / solución salina de fosfato tamponada
PCR: *polymerase chain reaction* / reacción en cadena de la polimerasa
PFA: *paraformaldehyde* / paraformaldehído
PGM: *phosphoglucomutase* / fosfoglucomutasa
PHF: *paired helical filaments* / filamentos pareados helicoidales
PHLPP1: *PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase* / proteína fosfatasa rica en dominios PH y leucina
PiD: *Pick's disease* / Enfermedad de Pick
PI3K: *phosphoinositide-3-kinase* / fosfoinosítido-3-quinasa
PIP3: *phosphatidylinositol trisphosphate* / fosfatidil inositol trifosfato
PKA: *protein kinase a* / proteína quinasa a
PKC: *protein kinase c* / proteína quinasa c
Poli-P: *poly-proline* / poli-prolina
Poli-Q: *poly-glutamine* / poli-glutamina
PP1: *protein phosphatase 1* / proteína fosfatasa 1
PP2A: *protein phosphatase 2A* / proteína fosfatasa 2A
PP2B: *protein phosphatase 2B* / proteína fosfatasa 2B
PPP2R2B: *regulatory subunit B protein phosphatase 2* / subunidad reguladora B de la proteína fosfatasa 2
PS: *presenilin* / presenilina
PSP: *progressive supranuclear palsy* / parálisis supranuclear progresiva
PT: *pretangle* / neurona con pre-ovillo
p-Ser: *phosphorylated serine* / serina fosforilada
p-Tyr: *phosphorylated tyrosine* / tirosina fosforilada
RIN: *integrity RNA number* / número de integridad del ARN
SBMA: *spinal and bulbar muscular atrophy* / atrofia muscular espinal y bulbar

SCA: *spinocerebellar ataxia* / ataxia espinocerebelosa
SDS: *sodium dodecyl sulphate* / dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: *SDS-polyacrilamide gel eletrophoresis* / gel de electroforesis de poliacrilamida con SDS
SEM: *standard error of mean* / error estándar de la media
Ser: *serine* / serina
SN: *Substantia nigra* / sustancia negra
SNC: *central nervous system* / sistema nervioso central
SRSF6: *serine arginine rich splicing factor 6* / factor de *splicing* rico en serinas y argininas
St: *striatum* / estriado
STN: *subthalamic nucleus* / núcleo subtalámico
Tal: *thalamus* / tálamo
TBP: *TATA box binding protein* / proteína de unión a la caja TATA
TNF α : *tumor necrosis factor- α* / factor de necrosis tumoral
TNRs: *tau nuclear rods*
tTA: *transactivator* / transactivador
Tyr: *tyrosine* / tirosina
U: *uracile* / uracilo
WB: *western blot*
ZNF9: *zinc finger 9* / dedo de zinc 9
WT: *wild type* / tipo salvaje

RESUMEN/SUMMARY

La Enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por atrofia cerebral particularmente en el estriado dando lugar a cambios de personalidad, corea y demencia. La glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) es una serina/treonina quinasa implicada en numerosas rutas de señalización y es capaz de fosforilar más de cien sustratos entre los que se encuentra la proteína asociada a microtúbulos Tau. Se cree que un incremento de la actividad GSK-3 contribuye a la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer (EA) y los inhibidores de GSK-3 se han postulado como agentes terapéuticos para la neurodegeneración. En referencia a la EH, los inhibidores de GSK-3 han mostrado efectos beneficiosos en modelos celulares y en modelos animales invertebrados pero no en los modelos murinos. Estos estudios se realizaron sin una exploración previa del nivel y la actividad de GSK-3 en el cerebro de los pacientes y modelos de EH.

Conforme a esto, el primer objetivo de esta tesis fue explorar el nivel y la actividad enzimática de GSK-3 en el estriado y otras regiones cerebrales menos afectadas de pacientes de la EH y del ratón modelo R6/1 para elucidar la posible contribución de su alteración en la patogénesis de la EH. Aquí demostramos que se produce una reducción dramática en los niveles y la actividad de GSK-3 en el estriado y la corteza de los pacientes de la EH y en el ratón modelo de la enfermedad. La corrección del déficit de GSK-3 en el ratón de la EH, mediante la combinación con un ratón transgénico con sobreexpresión moderada de GSK-3, resulta en la atenuación de la atrofia cerebral y de los déficits en el comportamiento motor y de aprendizaje de los ratones de EH.

En segundo lugar, nos propusimos estudiar uno de los principales sustratos de GSK-3, en relación a la neurodegeneración, la proteína Tau. En lugar de la esperada disminución de Tau fosforilado observamos un aparente aumento de Tau fosforilado que en realidad podría deberse a un posible aumento del Tau total o un cambio en el patrón de isoformas de Tau. Se sabe que el desbalance en las isoformas de Tau con tres o cuatro dominios de unión a microtúbulos causa demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17) en familias con mutaciones intrónicas. En esta segunda parte, reportamos que se produce un desbalance equivalente a nivel de ARNm y de proteína posiblemente como resultado de la alteración del factor de *splicing* SRSF6. Además, tiene lugar un incremento en el nivel de Tau total en el cerebro de los pacientes de la EH y hemos descrito un nuevo tipo de depósito de Tau en forma de varilla a los que hemos denominado *Tau nuclear rods* (TNRs) y que se encuentran rellenando las indentaciones nucleares de las neuronas previamente

reportadas en el cerebro de la EH. Finalmente, cuando reducimos el nivel de Tau en el ratón de EH se atenúan sus anormalidades motoras.

Con esto, nuestros resultados demuestran por un lado que, la disminución de GSK-3 contribuye al fenotipo de la EH y abre nuevas oportunidades terapéuticas basadas en incrementar la actividad de GSK-3 o atenuar las dañinas consecuencias de esta disminución y por el otro, que la EH puede ser considerada una tauopatía y por lo tanto, toda la terapéutica que se está desarrollando basada en la modulación de Tau, podría ser efectiva para la EH.

Huntington's disease (HD) is a hereditary neurodegenerative disorder characterized by brain atrophy particularly in striatum leading to personality changes, chorea and dementia. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is a serine/threonine kinase in the crossroad of many signaling pathways that is highly pleiotropic as it phosphorylates more than hundred substrates among which stands the microtubule-associated protein Tau. Increased GSK-3 activity is believed to contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease and GSK-3 inhibitors have been postulated as therapeutic agents for neurodegeneration. Regarding HD, GSK-3 inhibitors have shown beneficial effects in cell and invertebrate animal models but no evident efficacy in mouse models. Intriguingly, those studies were performed without interrogating GSK-3 level and activity in HD brain.

According to this, the first aim of this thesis was to explore the level and also the enzymatic activity of GSK-3 in the striatum and other less affected brain regions of HD patients and of the R6/1 mouse model to then elucidate the possible contribution of its alteration to HD. We report a dramatic decrease in GSK-3 levels and activity in striatum and cortex of HD patients with similar results in the mouse model. Correction of the GSK-3 deficit in HD mice, by combining with transgenic mice with low GSK-3 overexpression, resulted in amelioration of their brain atrophy and behavioral motor and learning deficits.

We decided to also study one of the main substrates of GSK-3 in relation to neurodegeneration, the Tau protein. Instead of the anticipated decrease in phosphorylated Tau, we observed an apparent increase that could also be attributable to a possible decrease in total Tau or to a change in the pattern of Tau isoforms. A disbalance in Tau isoforms containing either three or four microtubule-binding repeats causes frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome (FTDP-17) in families with intronic mutations. Here, we report equivalent disbalance at the mRNA and protein level possibly as a result of altered activity of the splicing factor SRSF6 and increased total Tau levels in the brains of Huntington's disease (HD) subjects. Besides, we have detected rod-like Tau deposits that we have called Tau-nuclear rods (TNRs) filling the neuronal nuclear indentations previously reported in HD brains. Finally, when we reduced the level of Tau in HD mice, their motor abnormalities were attenuated, thus demonstrating that the HD mutation ends up recruiting Tau as a mediator of its toxicity.

With this, our results demonstrate that on the one hand, decreased GSK-3 contributes to HD phenotype and open new therapeutic opportunities based on increasing GSK-3 activity or

attenuating the harmful consequences of its decrease and, on the other hand, HD can be considered a tauopathy and therefore, all therapeutics based on Tau modulation under development, may be effective for HD.

INTRODUCCIÓN

1. LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

1.1. Descripción general de la Enfermedad de Huntington

1.1.1. Primeras evidencias

La Enfermedad de Huntington (EH) también conocida como Corea de Huntington es un desorden neurodegenerativo monogénico, con un patrón de herencia autosómico dominante y, clínicamente caracterizado por movimientos involuntarios, síntomas psiquiátricos y demencia. La primera evidencia que se tiene de esta enfermedad, es en el siglo XV, cuando Paracelso (1493-1541) utilizó el término corea para referirse a un desorden del movimiento sugiriendo que se producía una alteración en el sistema nervioso central (SNC) como origen de esta alteración. En el siglo XVII, en Inglaterra se referían a esta enfermedad como el baile de San Vito y, debido a los movimientos involuntarios y espasmódicos, pensaban que las personas que la sufrían, estaban endemoniadas. Pero fue en 1872, cuando el médico George Huntington describió en detalle por primera vez esta enfermedad en una familia americana de ascendencia inglesa por lo que recibió el nombre de Enfermedad de Huntington (EH). Años más tarde, tras la apreciación de la naturaleza hereditaria de esta enfermedad, los genetistas se centraron en la búsqueda de comunidades de afectados por este trastorno para buscar el origen de la enfermedad. De este modo, se encontró una comunidad de personas en la región de la costa occidental del Lago Maracaibo en Venezuela, en la que como consecuencia de un efecto fundador hay muchas personas afectadas por la enfermedad y, muchas otras en riesgo de padecerla. El estudio de esta población, permitió por un lado profundizar en el conocimiento de la neuropatología de la enfermedad y, por otro lado la identificación de la mutación responsable de la EH en 1993 (HDCRG, 1993).

1.1.2. Síntomas

Los pacientes de EH, se caracterizan por tener síntomas motores, psiquiátricos y cognitivos. La edad de aparición de éstos, se encuentra entre los 35 y 50 años de edad (Vonsattel and DiFiglia, 1998), aunque existen formas juveniles en la que los pacientes desarrollan la enfermedad antes de los 20 años y, cuyos síntomas son más severos (Nance and Myers, 2001, Ruocco et al., 2006). El síntoma más característico de la enfermedad es la corea, que comienza como un temblor y, que progresa hacia movimientos involuntarios, espasmódicos y bruscos de las extremidades. También se produce distonía y mioclonía de los músculos voluntarios. Todo esto lleva al paciente a tener gran dificultad para andar, hablar y

tragar, haciéndose totalmente dependientes de otras personas. Las manifestaciones psiquiátricas que son las primeras en aparecer junto a los déficits cognitivos, incluyen ansiedad, cambios de personalidad, apatía, depresión, paranoia y fobias, siendo el suicidio algo común en estos pacientes (Rosenblatt, 2007). En cuanto a los síntomas cognitivos hay daño gradual de los procesos mentales que incluyen el razonamiento, el juicio, la memoria y que progresan hasta llevar al paciente a un estado de demencia. Otros síntomas reportados son la pérdida de peso, alteraciones en el comportamiento sexual y alteraciones en los ciclos vigilia-sueño (Politis et al., 2008). Finalmente, los pacientes mueren alrededor de 20 años después de la aparición de los síntomas.

1.1.3. Neuropatología

El estriado es la zona más afectada donde se produce la mayoría de la pérdida neuronal y de la atrofia en la EH. Pero conforme la enfermedad progresa, la atrofia también afecta a la corteza cerebral (particularmente a las capas III, V y VI). Éstas dos son las principales marcas neuropatológicas de la enfermedad (Vonsattel and DiFiglia, 1998). Pero también afecta a otras regiones como el hipocampo, el globo pálido, el tálamo, el núcleo subtalámico, la sustancia negra, la materia blanca y el cerebelo de forma muy marcada (Vonsattel and DiFiglia, 1998) y el hipotálamo (que puede explicar la pérdida de peso observada en los pacientes) (Kassubek et al., 2004, Politis et al., 2008).

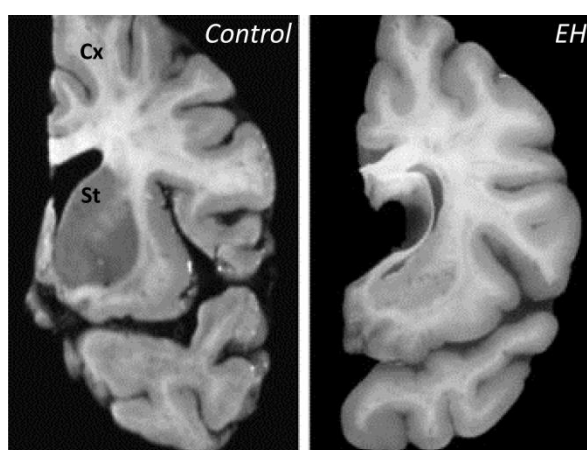


Figura 1. Atrofia cerebral en pacientes de la EH. Comparación de la sección coronal de cerebro de un control humano (izquierda) y de un paciente de la EH (derecha) donde se observa la degeneración muy marcada del estriado (St) y atrofia de la corteza cerebral (Cx). (Imagen adaptada de (Sorolla et al., 2008)).

Para conocer el grado de severidad de la enfermedad en los cerebros *post-mortem*, se utiliza el Sistema de Vonsattel que clasifica los casos en cinco grados en función del patrón de degeneración del estriado. El estriado de un paciente grado 0 es indistinguible de uno sano, pero mediante análisis histológico se puede ver que ha perdido el 30-40% de las neuronas en la cabeza del caudado. El grado 1 muestra atrofia, pérdida neuronal y astrogliosis en la cola del caudado y, en ocasiones, en el cuerpo del núcleo caudado. El 2 y el 3, se caracterizan por una atrofia estriatal severa. Y por último, en el grado 4, además de una gran cantidad de atrofia, se produce casi el 95% de pérdida neuronal (Vonsattel et al., 1985).

La EH está englobada dentro del grupo de enfermedades que afectan al circuito de los ganglios basales. Éstos, son un grupo de núcleos subcorticales implicados en una gran variedad de procesos en los que destacan el control de las funciones motoras. Están formados por el estriado (caudado y putamen), el globo pálido (externo (GPe) e interno (GPi)), la sustancia negra (SN), el núcleo subtalámico (STN) y el tálamo. El mayor *input* de información a los ganglios basales llega desde la corteza hasta el estriado. Esto es lo que se conoce como la ruta cortico-estriatal consistente en inervaciones glutamatérgicas y dopaminérgicas que llegan al estriado desde la corteza. Aquí, la información es recibida por las neuronas espinosas de tamaño medio (MSSNs) que constituyen el 95% de la población neuronal del estriado y, son GABAérgicas y, son las más afectadas en la EH. El otro 5% corresponde a las interneuronas que no están afectadas. En este punto se pueden dar dos vías: la vía directa y la vía indirecta. La vía directa, es responsable de la activación de los movimientos voluntarios y, consiste en que las MSSNs que expresan dopamina D1 y sustancia P, proyectan hacia el GPi, de allí al tálamo y después la información procesada vuelve a la corteza motora para enviar señales a los músculos. Por otro lado, la vía indirecta, que es responsable de la inhibición de componentes involuntarios del movimiento y, en la que las MSSNs que expresan dopamina D2 y colocan con encefalina, proyectan hacia el GPe, de allí atravesando el STN hasta la SN y, de allí, la información vuelve al GPi y otra vez al tálamo hasta la corteza motora (Albin et al., 1989, Alexander and Crutcher, 1990). El equilibrio de ambas rutas permite la correcta realización de los movimientos. En la EH, las neuronas GABAérgicas que contienen encefalina y que proyectan desde el estriado al GPe (vía indirecta), están más afectadas que las neuronas que contienen sustancia P y proyectan al GPi (vía directa) (Reiner et al., 1988). Se piensa que así, se pierde la inhibición mediada por la vía indirecta dominando la vía directa lo que conduciría a una hiperactividad incontrolable del sistema motor con los característicos movimientos coreicos de la EH (Waldvogel et al., 2014).

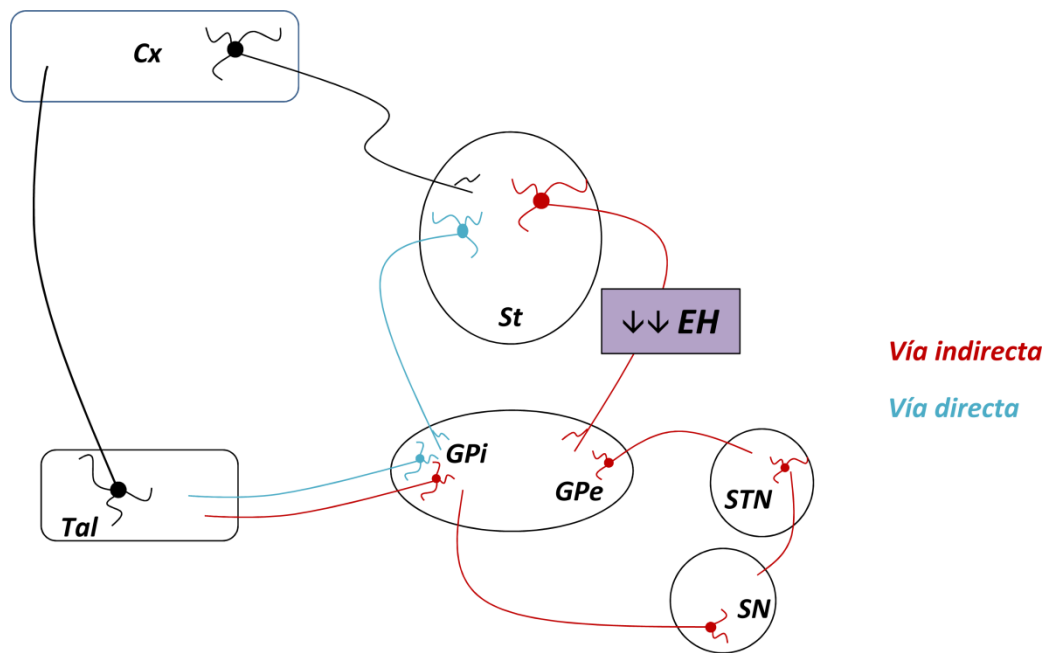


Figura 2. Circuito de los ganglios basales. Representación esquemática de la vía directa (azul) e indirecta (rojo) del circuito de los ganglios basales que controla los movimientos. Cx: corteza; EH: Enfermedad de Huntington; GPi: globo pálido interno; GPe: globo pálido externo; SN: sustancia negra; St: estriado; STN: núcleo subtalámico; Tal: tálamo.

1.2. La mutación

La EH está causada por una mutación localizada en el exón 1 del gen *IT15* (renombrado como gen de la huntingtina (*HTT*) en la región p16.3 del cromosoma 4 (HDCRG, 1993). La mutación consiste en la expansión del número de repeticiones de un triplete de nucleótidos formado por: C (citosina), A (adenina) y G (guanina), que codifica la síntesis del aminoácido glutamina. Mientras que los individuos que no están afectados por la enfermedad, tienen entre 6 y 35 repeticiones del triplete, los pacientes de la EH siempre tienen más de 35 CAG. Se han llegado a encontrar pacientes hasta con 100 tripletes CAG (HDCRG, 1993). También se ha visto que, los individuos que no presentan síntomas pero que tienen un número de repeticiones entre 27 a 35, pueden transmitir la enfermedad a sus hijos, por un fenómeno conocido como “anticipación génica” (Ranen et al., 1995). Este fenómeno se debe a que las repeticiones no son estables y, tienden a expandirse cuando se transmite de generación a generación, sobre todo cuando el gen se hereda por vía paterna debido a que durante la mitosis, el riesgo de expansión es mayor en la espermatogénesis que en la ovogénesis.

Además, existe una relación inversa entre el número de repeticiones y la edad de inicio y una proporción directa entre el número de tripletes y el grado de severidad de la enfermedad, siendo más severa y temprana cuanto mayor número de repeticiones.

La transcripción y traducción del gen *HTT*, da lugar a la proteína huntingtina (HTT), que debido a la expresión de las CAG expandidas en el gen mutado, da lugar a una proteína mutada con una gran secuencia de poliglutaminas (poli-Q). El mecanismo exacto por el que la secuencia de CAG expandida en el ARNm y/o la poliglutamina en la proteína inducen neurodegeneración es desconocida. Sin embargo, las formas N-terminales de la HTT se acumulan en el citoplasma e interaccionan con muchas proteínas alterando diferentes mecanismos celulares y produciendo daño de las vías de señalización (Ross and Tabrizi, 2011).

1.3. Función normal de la Huntingtina

La HTT es una proteína soluble de 3144 aminoácidos y 384 KDa que se expresa de forma ubicua en humanos, con elevados niveles en las neuronas del sistema nervioso central y los testículos. Intracelularmente, está asociada con varios orgánulos como el núcleo, el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi y, también se puede encontrar en las neuritas y las sinapsis donde se asocia con vesículas y microtúbulos.

Para entender su función, es fundamental conocer su estructura. Se caracteriza por tener la secuencia poli-Q en la región N terminal (en humanos empieza en el aminoácido 18) y, en los individuos no afectados tiene hasta 34 glutaminas. Se ha sugerido que, su función fisiológica es unir factores de transcripción que contienen secuencias poli-Q (Perutz et al., 1994) y regular la unión de la HTT con otras proteínas (Harjes and Wanker, 2003). En los vertebrados superiores, tiene al lado una región poliprolina (poli-P) que la estabiliza y la mantiene soluble. A continuación, tiene varias repeticiones HEAT organizadas en dominios que son importantes para las interacciones proteína-proteína (Andrade and Bork, 1995). Esta proteína también contiene una señal de exportación nuclear (NES) y una señal de localización nuclear (NLS) indicando que la proteína está implicada en transporte de moléculas núcleo-citoplasma (Xia et al., 2003). La HTT también contiene sitios consenso de corte por enzimas proteolíticas, como las caspasas 2, 3, 6 y 7, la calpaína y aspartil-proteasas, y que generan fragmentos que se acumulan en el núcleo y en el citoplasma tanto de la HTT normal como de la mutada pero que se desconoce su función.

Debido a la complejidad de la HTT, se han propuesto multitud de mecanismos en los que puede estar implicada. La HTT es necesaria en el desarrollo embrionario ya que se ha descrito que el ratón knockout para HTT (Hdh^{-/-}) es letal embrionario porque se produce un defecto en la formación del tejido extraembrionario (Duyao et al., 1995, Nasir et al., 1995). Cuando se reduce la dosis de la HTT al 50%, se producen defectos en la formación del epiblasto que es la estructura que forma el tubo neural, por lo que la HTT está implicada en la formación del SNC (White et al., 1997). La HTT está implicada en la mitosis ya que durante ésta, se localiza en los polos del huso mitótico. Cuando se silencia con ARN de interferencia se altera la orientación del huso y el destino celular de los progenitores corticales (Godin et al., 2010). Otros estudios han demostrado que es antiapoptótica ya que en líneas celulares derivadas de cerebro en las que se ha sobreexpresado HTT normal, se produce una protección frente estímulos tóxicos (Rigamonti et al., 2000). Esta proteína también controla la producción de BDNF, que es una neurotrofina importante para la supervivencia de neuronas estriatales y la actividad de la sinapsis cortico-estriatales (Zuccato and Cattaneo, 2007). Como hemos mencionado, la HTT se encuentra asociada con vesículas y microtúbulos facilitando el transporte vesicular.

1.4. Mecanismos patogénicos de la Enfermedad de Huntington

1.4.1. Pérdida de la función de la Huntingtina normal

Los datos anteriores nos indican que la HTT normal tiene efectos beneficiosos en el cerebro, por lo que puede ser posible que la pérdida de función de la HTT reduzca la habilidad de las neuronas de sobrevivir (Cattaneo et al., 2005). Individuos homocigotos para la expansión de CAG presentan una progresión más severa de la enfermedad que los que portan la mutación en heterocigosis (Squitieri et al., 2003). El impacto real de la pérdida de la HTT normal se ha evaluado mediante la manipulación genética de los niveles de HTT, como por ejemplo reduciendo el nivel de HTT normal en un ratón YAC128 modelo de la enfermedad, el cual presenta una pérdida de neuronas y una atrofia cerebral ligera indicando que el fenotipo estriatal depende de la HTT mutada y al reducir la HTT normal aumenta la toxicidad y el déficit en el comportamiento motor por lo que la reducción de HTT normal exacerba este fenotipo (Van Raamsdonk et al., 2005). En *Drosophila*, la reducción de HTT en un modelo con toxicidad por poliglutamina acelera el fenotipo neurodegenerativo (Zhang et al., 2009). Por el contrario,

cuando se sobreexpresa el gen de la *Htt* en el ratón R6/2, se ve que hay un retraso en la aparición del fenotipo y que la atrofia cerebral es menos severa (Dietrich et al., 2006).

1.4.2. Toxicidad de la proteína

La presencia de la secuencia expandida de poli-Q en la HTT mutada, produce que la proteína adquiera una conformación anormal (Tobin and Signer, 2000, Shao and Diamond, 2007) y con ello, una ganancia de función que altera la homeostasis de la célula interfiriendo en numerosos procesos celulares. En primer lugar, la forma larga de la HTT mutada puede ser cortada por numerosas proteasas en el citoplasma (DiFiglia et al., 2007, Schilling et al., 2007, Landles et al., 2010), generando fragmentos tóxicos N-terminales (que contienen la expansión). En un intento por eliminar estos fragmentos tóxicos, estos son ubiquitinados y dirigidos al proteasoma para que sean eliminados. Pero el sistema ubiquitina-proteasoma es menos eficiente en la EH (Ortega and Lucas, 2014). Estos fragmentos de HTT N-terminal se pueden acumular en el citoplasma, e interaccionar con muchas proteínas afectando a sus rutas de señalización o formar agregados o los cuerpos de inclusión característicos de la enfermedad. La Htt mutada puede contribuir a la pérdida de la homeostasis del calcio y, a la disfunción mitocondrial comprometiendo el metabolismo energético e incrementando el daño oxidativo (Panov et al., 2002). Por otro lado, la mutación en HTT altera las funciones motoras del citoesqueleto, incluyendo el transporte y el reciclaje vesicular (Caviston and Holzbaur, 2009) mediante la interacción de la HTT con HAP1, HAP40 (*Huntingtin associated protein of 40KDa*) y la dineína (Ravikumar et al., 2008) También puede interferir en numerosas rutas de señalización mediante alteración de las quinasas (que explicaremos más detalladamente a continuación). Por otro lado, los fragmentos pueden ser traslocados al núcleo, donde pueden contribuir a la alteración de la transcripción de numerosos genes entre los que se incluyen CREB o TAF130 que producen una disminución en los niveles de ARNm y proteína BDNF, la neurotrofina esencial para el mantenimiento de las MSSN y que se ha visto que en los pacientes de EH está reducida (Ferrer et al., 2000, Zuccato et al., 2008) y, formar inclusiones intranucleares (Figura 3). También se ha descrito que en otras enfermedades causadas por expansiones, se puede producir el fenómeno de la traducción sin ATG asociada a repeticiones (traducción RAN) en las que a partir de las construcciones CAG expandidas se expresan proteínas con poliglutaminas, polialaninas y poliserinas en ausencia del codón de inicio ATG como en la SCA8 y la DM1 (Zu et al., 2011, Cleary and Ranum, 2013).

Alteración de rutas de señalización y quinasas

Las quinasas fosforilan otras proteínas para regular su función y mediar en muchas rutas de señalización celular y sus efectos (Manning et al., 2002). Muchas de estas rutas afectadas por diversas quinasas contribuyen a la patofisiología de la EH (Bowles and Jones, 2014) llevando a la desregulación de la transcripción (Ross, 2002, Bowles et al., 2012), la inflamación (Lin et al., 2013) y, la neurodegeneración en modelos celulares y murinos de la EH, así como en cerebro de pacientes mediante la regulación directa de estas quinasas o la fosforilación de otras proteínas (Bowles and Jones, 2014). Así, se ha visto que en la EH están alteradas rutas como la ruta MEK/ERK, la ruta CDK-5/p35 y la señalización mediada por JNK o p53, entre otras. Una de las más estudiadas es la ruta de AKT, cuya activación se considera que es antiapoptótica y neuroprotectora (Noshita et al., 2001, Gines et al., 2003, Endo et al., 2006) ya que fosforila e inactiva maquinaria proapoptótica como GSK-3 β , BCL-2 o HDAC3 entre otras (Gines et al., 2003, Cabodi et al., 2009, Bardai and D'Mello, 2011). Normalmente el nivel de AKT está bajo en cerebro adulto (Cabodi et al., 2009) y se activa tras un estrés o daño (Chong et al., 2005) generalmente por la vía de PI3K debida a señalización por factores de crecimiento o citoquinas (Chong et al., 2005). Se ha descrito que AKT está activada en varios modelos celulares y de ratón de la EH debido a la reducción de su inhibidor PHLPP1 en el estriado (Saavedra et al., 2010) y, que también está activada en humanos (Humbert et al., 2002). En *Drosophila*, se ha visto que la activación de AKT por fosforilación protege, ya que alivia la toxicidad en la retina inducida por la HTT mutada aunque no previene la letalidad (Lievens et al., 2008) mediante la fosforilación protectora de la HTT mutada en la serina 421 ya que reduce su toxicidad y la acumulación de sus fragmentos (Humbert et al., 2002).

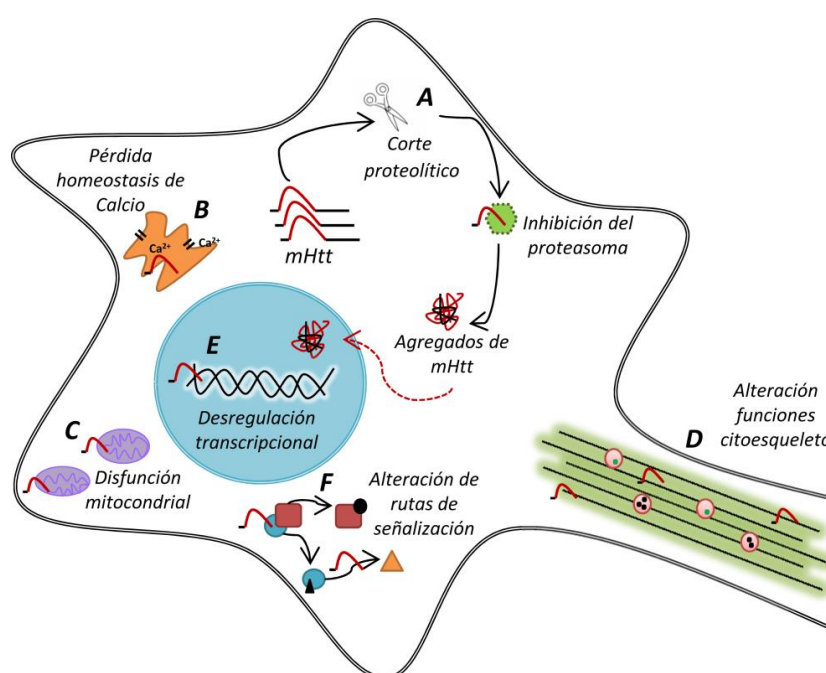


Figura 3. Mecanismos patológicos celulares propuestos en la EH.

1.4.3. Toxicidad del ARN - Enfermedades causadas por expansión de la secuencia CAG

La EH pertenece al grupo de enfermedades causadas por la expansión de repeticiones de trinucleótidos que incluye al menos 22 patologías hereditarias (La Spada and Taylor, 2010). Dentro de éstas, tenemos la subcategoría de las causadas por expansiones de CAG que incluyen además de la EH, otros desórdenes como numerosas ataxias espinocerebelosas como SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA12 y SCA17, la atrofia dentatorubropalidoluisiana (DRPLA) y la atrofia muscular espinobulbar (SBMA). Cada una de estas enfermedades afecta a poblaciones de neuronas específicas en función del gen afectado por la expansión (Cattaneo et al., 2001). También tenemos la categoría de los desórdenes causados por repeticiones CUG (citosa-uracilo-guanina) como SCA 8, la distrofia miotónica 1 (DM1) y la Enfermedad de Huntington tipo 2 (HDL-2) (Nelson et al., 2013) (Tabla 1).

Además de los diferentes mecanismos que pueden explicar la causa de estas enfermedades, como la pérdida de la función del gen y por tanto, de la proteína que contiene la mutación; la ganancia de función tóxica debido a la producción de una proteína con una expansión poli-Q que ya hemos explicado, también puede producirse la ganancia de función tóxica debida a la producción de un ARNm con expansión CAG o CUG como es el caso de aquellas enfermedades en que la expansión se encuentra localizada en regiones del gen que no se traducen y que no se pueden explicar por la presencia de una proteína tóxica como DM1 o SCA-17. En el caso de la SCA8 se descubrió que la patogenicidad está causada por la expansión CAG en el gen de la ataxina 8 generando una proteína portadora de la expansión poli-Q y, por la expresión de la cadena opuesta del gen de la ataxina 8 que cuando se transcribe da lugar a un ARN con una expansión CUG no codificante (Moseley et al., 2006, Daughters et al., 2009). Las repeticiones en el ARNm, pueden formar estructuras en forma de horquilla, que aumentan en tamaño y en estabilidad con el aumento del tamaño de la expansión. Estas horquillas pueden secuestrar diversas proteínas (Nalavade et al., 2013). Se ha descrito que algunos factores de *splicing* se unen al transcrito con el CUG expandido dando lugar a un *splicing* alternativo aberrante de numerosos genes (Ranum and Cooper, 2006). Recientemente se ha descrito que las repeticiones CAG también son capaces de mimetizar a las repeticiones CUG en la alteración de la regulación del *splicing* alternativo (Mykowska et al., 2011). Además, en el caso concreto de la EH, se ha descrito que se produce un evento de

splicing alternativo que puede contribuir a la generación de fragmentos N-terminal muy tóxico de HTT contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad (Sathasivam et al., 2013).

Tabla 1: Características moleculares y síntomas clínicos de los trastornos neurológicos hereditarios causados por expansión de trinucleótidos CAG y CUG.

Enfermedad	Síntomas	Repetición causante	Gen	Localización de la repetición
HD	Corea, distonía, decline cognitivo, alteraciones psiquiátricas	CAG	<i>HTT</i>	Región codificante
HDL2	Corea, distonía, decline cognitivo	CTG	<i>JPH3</i>	3'UTR, Región codificante
SBMA	Debilidad en las extremidades proximales, afectación de las motoneuronas	CAG	<i>AR</i>	Región codificante
DRPLA	Convulsiones, coreoatetosis, ataxia, deterioro cognitivo	CAG	<i>ATN1</i>	Región codificante
SCA1	Ataxia, disartria, espasticidad, oftalmoplejía	CAG	<i>ATXN1</i>	Región codificante
SCA2	Ataxia, movimiento ocular lento, hiporreflexia, enfermedad motora con parkinsonismo ocasional	CAG	<i>ATXN2</i>	Región codificante
SCA3	Ataxia, distonía	CAG	<i>ATXN3</i>	Región codificante
SCA6	Ataxia, disartria, pérdida sensorial episódica	CAG	<i>CACNA1A</i>	Región codificante
SCA7	Ataxia, disartria, distrofia de retina	CAG	<i>ATXN7</i>	Región codificante
SCA12	Temblor, ataxia, espasticidad, demencia	CAG	<i>PPP2R2B</i>	Desconocido
SCA17	Ataxia, demencia, corea, convulsiones, distonía	CAG	<i>TBP</i>	Región codificante
DM1	Debilidad muscular, miotonía, alteraciones cardíacas, retraso mental	CTG	<i>DM1</i> también conocido como <i>DMPK</i>	3'UTR
DM2	Debilidad muscular, miotonía, alteraciones cardíacas	CTG	<i>ZNF9</i> también conocido como <i>CNBP</i>	Intrón

AR, receptor de andrógenos; *ATN1*, atrofina 1; *ATXN*, ataxina; *CACNA1A*, subunidad α -1A del canal de calcio dependiente de la voltaje; *DM*, distrofia miotónica; *DRPLA*, atrofia Dentatorubro-palidoluisiana; *HD*, Enfermedad de Huntington; *HDL2*, Enfermedad de Huntington tipo 2; *HTT*, huntingtina; *JPH3*, juntofilina 3; *PPP2R2B*, subunidad reguladora B de la proteína fosfatasa 2; *SBMA*, atrofia muscular espinal y bulbar; *SCA*, ataxia espinocerebelosa; *TBP*, proteína de unión a la caja TATA; *ZNF9*, dedo de zinc 9.

2. GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 (GSK-3)

2.1. Descripción

La enzima Glucógeno Sintasa Quinasa 3 (GSK-3) es una serina/treonina quinasa (aunque durante su síntesis también puede actuar como tirosina quinasa) que media la adición de moléculas fosfato en residuos serina y treonina en sus sustratos diana, expresada en todos los tejidos aunque sus niveles son más elevados en el cerebro. Existen dos parálogos de este enzima, GSK-3 α y GSK-3 β y también se ha descrito una variante de *splicing* de GSK-3 β (Mukai et al., 2002). Los dos parálogos son casi idénticos, particularmente en su dominio catalítico quinasa (Woodgett, 1990), y son regulados por múltiples mecanismos (Grimes and Jope, 2001, Doble and Woodgett, 2003, Beurel et al., 2014) incluyendo la prefosforilación de los sustratos, la localización subcelular, la incorporación a complejos de proteínas como axina/APC, D2R/ β -arrestina (Beaulieu et al., 2008, O'Brien et al., 2011) o D2R/Disc1 (Su et al., 2014) y modificaciones postraduccionales como la fosforilación en el residuo serina N-terminal (Ser 21/9 para α y β respectivamente) que hace que la quinasa esté inactiva en algunos de sus posibles escenarios funcionales (Beurel et al., 2014). GSK-3 es un enzima pleiotrópico que es capaz de fosforilar más de 100 proteínas implicadas en funciones como el metabolismo, la estructura celular, la expresión génica y la apoptosis (Grimes and Jope, 2001, Beurel et al., 2014).

2.2. Mecanismos de regulación de la actividad GSK-3

2.2.1. Fosforilación

Una de las maneras en las que se regula la GSK-3 es mediante fosforilación. El mecanismo más estudiado es la inhibición de su actividad mediante la fosforilación en la serina 21 en GSK-3 α y en la serina 9 en GSK-3 β . Cuando esto ocurre, la región N-terminal de GSK-3, actúa como un pseudosustrato prefosforilado, capaz de unirse al dominio de unión de sustratos de GSK-3 que forma un bolsillo, bloqueando así la unión de otros sustratos prefosforilados a la enzima y, por tanto, disminuyendo su actividad (Beurel et al., 2014). La fosforilación en estos residuos es llevada a cabo por diferentes quinasas, como AKT, proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC) y la quinasa p70 S6 entre otras, que participan en diferentes rutas de señalización haciendo de GSK-3 una enzima que integra múltiples señales. Una excepción a este mecanismo es que la actividad de GSK-3 no se ve afectada por su fosforilación cuando la enzima está formando complejos (Beurel et al., 2014).

GSK-3 también promueve la actividad de la proteína fosfatasa 1 (PP1) mediante la fosforilación de su inhibidor llamado I2. Esta activación de PP1, no solo aumenta la actividad de GSK-3, también defosforila quinasas que se encuentran regulando GSK-3, disminuyendo la inducción de la fosfoserina GSK-3 (Zhang et al., 2003).

También se ha visto que, la fosforilación en la tirosina 279 en GSK-3 α y en la tirosina 216 en GSK-3 β se requiere para que haya una máxima actividad del enzima. Esto puede tener lugar mediante autofosforilación o por la acción de otras tirosina quinasas. (Grimes and Jope, 2001).

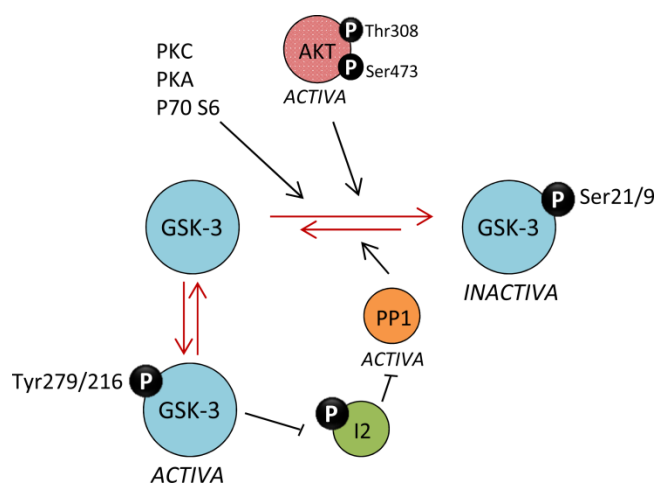


Figura 4: Regulación de la actividad de GSK-3 dependiente de fosforilación. La figura muestra algunas de las señalizaciones que se ha propuesto que median la activación de GSK-3 vía fosforilación en Tyr279/216 o la inhibición por fosforilación en Ser21/9.

2.2.2. Formación de complejos

La actividad de GSK-3 se puede regular mediante su incorporación en complejos de proteínas que reclutan los sustratos de GSK-3 para su fosforilación. El ejemplo mejor conocido es el complejo implicado en la ruta de señalización de Wnt formado por Axina, la proteína APC, β -catenina y GSK-3 (Frame and Cohen, 2001, Manoukian and Woodgett, 2002). La formación de este complejo permite que la β -catenina se aproxime a GSK-3 resultando fosforilada en los residuos 33, 37 y 41 lo cual actúa como una señal para ser ubiquitilada o degradada. Cuando se unen los ligandos de Wnt, el complejo se deshace y la β -catenina no es fosforilada por GSK-3, lo que hace que la β -catenina se acumule y se trasloque al núcleo.

Otras proteínas con las que puede interaccionar GSK-3 y formar complejos para llevar a cabo funciones específicas son miembros de la familia 14.3.3, la proteína 4.1R (Ruiz-Saenz et al., 2013) que regula GSK-3 en los microtúbulos o el activador de CDK-5 p25 (Chow et al., 2014).

2.2.3. Localización subcelular

La localización de GSK-3 es importante a la hora de regular sus acciones. Es una proteína citosólica (donde está localizada predominantemente) pero también puede estar presente en la mitocondria, en el núcleo y en otros compartimentos subcelulares como los conos de crecimiento. La función de GSK-3 en la mitocondria no se conocen demasiado pero parece que es importante en el estrés oxidativo y en determinadas condiciones apoptóticas (Bijur and Jope, 2003). En el núcleo, GSK-3 regula la actividad de numerosos factores de transcripción como Fos/Jun AP-1, CREB, NFAT, myc, p53 entre otras permitiendo que GSK-3 influya sobre muchas rutas de señalización que convergen en estos factores de transcripción y que regulan la expresión de muchos genes (Grimes and Jope, 2001). También en el núcleo afecta la regulación de diferentes mecanismos epigenéticos como la fosforilación de histonas, histonas deacetilasas (HDAC3, HDAC4), y enzimas modificadores de ADN como DNMT1 (Sun et al., 2007, Bardai and D'Mello, 2011).

2.3. Funciones de GSK-3

GSK-3 está implicada en numerosas rutas de señalización intracelular, incluyendo la migración, la proliferación celular, la apoptosis, la regulación del metabolismo de la glucosa, la inflamación y la respuesta inmune. GSK-3 regula la arquitectura celular y la motilidad de las neuronas y los astrocitos ya que la inactivación y activación de esta enzima promueven el crecimiento y el colapso de neuritas. Los microtúbulos son un tipo de filamentos del citoesqueleto que son cruciales para el mantenimiento de la organización, estructura y motilidad celular. Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) juegan un papel esencial en regular la función de los microtúbulos. Algunas MAPs, como Tau o MAP1B son fosforiladas por GSK-3, lo que regula su unión a los microtúbulos regulando la dinámica de estos. GSK-3 también fosforila la cadena ligera de la quinesina, lo que facilita el transporte de proteínas y vesículas a lo largo de los microtúbulos (Morfini et al., 2002). La retracción y extensión de las neuritas que son procesos cruciales en el desarrollo y remodelado del sistema nervioso

también son reguladas por GSK-3 que se encuentra en el borde anterior del cono de crecimiento en su forma inactiva, sugiriendo que GSK-3 activa inhibe la extensión del cono de crecimiento (Eickholt et al., 2002). En consecuencia, la inactivación experimental de GSK-3 produce la expansión del cono de crecimiento, la extensión axonal y aumenta las ramificaciones (Lucas et al., 1998, Hall et al., 2002).

GSK-3 contribuye tanto a la muerte como a la supervivencia celular. La sobreexpresión de GSK-3 induce apoptosis (Pap and Cooper, 1998) en una gran cantidad de condiciones como la retirada de factores tróficos, inhibición de fosfatidinositol-3 quinasa y la toxicidad inducida por el β -amiloide en la EA (Grimes and Jope, 2001). Tanto la fosforilación de EIF2 β (factor de iniciación eucariótico 2 β), la activación de c-Jun, o la inhibición de factores de transcripción pro-supervivencia como CREB o la proteína de choque térmico 1 (HSP1) mediadas por GSK-3, favorecen la apoptosis (Pap and Cooper, 2002, Hongisto et al., 2003). La inhibición de GSK-3 con litio protege frente a dichos estímulos apoptóticos (Bijur et al., 2000, Li et al., 2002). Por el contrario, la actividad GSK-3 también es esencial para la supervivencia en determinadas situaciones. El ratón knock-out para GSK-3 β , se desarrolla normalmente hasta la mitad de la gestación, pero muere en el día E14 por apoptosis masiva de los hepatocitos por un exceso de función proapoptótica inducida por el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Hoeflich et al., 2000). TNF- α activa apoptosis por la ruta extrínseca por activación de los receptores de muerte de la familia TNF α /Fas y, esta fue la primera evidencia de que GSK-3 juega un papel antiapoptótico cuando la apoptosis es inducida por la ruta extrínseca (Beurel and Jope, 2006, Gomez-Sintes et al., 2007, Gomez-Sintes and Lucas, 2010, 2013).

2.4. Implicaciones de GSK-3 en la etiología de diversas enfermedades

GSK-3 se ha implicado en numerosas enfermedades como la hipertrofia muscular (Hardt and Sadoshima, 2002, Haq et al., 2003), el cáncer (Hill and Hemmings, 2002, Manoukian and Woodgett, 2002), el trastorno bipolar (Jope, 1999, Phiel et al., 2001), la esquizofrenia (Beaulieu et al., 2004, Li et al., 2010), la diabetes tipo 2 y la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Grimes and Jope, 2001, Hernandez et al., 2013).

La EA es una enfermedad severa neurodegenerativa característica de las edades avanzadas cuyos síntomas incluyen la desorientación, la pérdida de memoria, alteraciones de la conducta y trastornos del lenguaje. El 95% de los casos son esporádicos y sólo el 5% son

familiares. Las formas familiares son debidas a mutaciones en los genes de la presinilina (PS-1), de presenilina 2 (PS-2) o de la proteína precursora del amiloide (APP) (Hardy, 2006). En esta enfermedad se ha visto que GSK-3 está implicada (Grimes and Jope, 2001). Las dos marcas histopatológicas características de la EA son los ovillos neurofibrilares que son agregados de filamentos pareados helicoidales (PHFs) compuestos primariamente por Tau hiperfosforilado que se encuentran en el interior de las células aunque se pueden encontrar fuera una vez la neurona muere y, las placas de β -amiloide, que son depósitos extracelulares compuestos de la proteína amiloide. GSK-3 está implicada en diferentes mecanismos patológicos de la EA. El β -amiloide activa GSK-3 y la inhibición de GSK-3 atenúa la neurotoxicidad inducida por el β -amiloide (Grimes and Jope, 2001). Además, GSK-3 promueve la producción de β -amiloide (Phiel et al., 2003). Además GSK-3 es una de las quinasas principales que participan en la hiperfosforilación de Tau que dan lugar a la formación de los PHFs (Hanger et al., 1992). También se ha visto que la presinilina 1, una proteína que contribuye a la producción de β -amiloide, y que como hemos dicho está mutado en casos de EA familiar, sus mutaciones aumentan la actividad de GSK-3 frente a Tau y alteran la motilidad mediada por quinesina comprometiendo la función neuronal (Pigino et al., 2003).

En el caso del trastorno bipolar que es una enfermedad mental cuyos síntomas clínicos están caracterizados por cambios de ánimo que oscilan desde episodios depresivos con pérdida de interés, de apetito, alteración del sueño e ideas suicidas a episodios maníacos caracterizados por hiperactividad, irritabilidad e incapacidad de conciliar el sueño (Shastry, 2005). Como terapia se usan antidepresivos como el litio y diferentes estudios apuntan a una implicación de GSK-3 en la patogénesis ya que se ha visto que en depresión hay una reducción de la señalización PI3K/AKT, lo que aumentaría la actividad de GSK-3 (Jope and Roh, 2006).

2.5. Potencial terapéutico de los inhibidores de GSK-3

Como hemos visto en el apartado anterior, se ha postulado que la actividad aumentada de GSK-3 contribuye a la patogénesis de numerosas enfermedades como la EA y el trastorno bipolar. De acuerdo con esto, el inhibidor no selectivo de GSK-3, litio se ha utilizado como terapia para el trastorno bipolar (Grof and Muller-Oerlinghausen, 2009) y se ha explorado su potencial en ensayos clínicos para la EA (Macdonald et al., 2008, Forlenza et al., 2011). El litio se une directamente a la GSK-3 y la inhibe por competición por el sitio de unión del magnesio (Klein and Melton, 1996, Stambolic et al., 1996) además de aumentar la

fosforilación inhibitoria en serinas de GSK-3 (Jope 2003). Pero hay que tener en cuenta que el litio también inhibe otras enzimas como la inositol polifosfato 1-fosfatasa (IPPasa), la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa) y la fosfoglucomutasa (PGM) (Gould et al., 2006). Por ello se están desarrollando numerosos inhibidores selectivos para GSK-3 para ser utilizados para el tratamiento de las enfermedades anteriormente mencionadas (Cohen and Goedert, 2004, Arfeen and Bharatam, 2013, Beurel et al., 2014, Lovestone et al., 2014).

2.6. GSK-3 y Enfermedad de Huntington

En la EH, se ha visto que la inhibición de GSK-3 en modelos celulares protege frente a la muerte celular inducida por poliglutamina y reduce el número de inclusiones de HTT (Carmichael et al., 2002, Valencia et al., 2010). Lo mismo ocurre en modelos animales de invertebrados (Berger et al., 2005, Voisine et al., 2007). Sin embargo, la eficacia terapéutica de la inhibición de GSK-3 no es tan evidente en los modelos de ratones (Wood and Morton, 2003) a no ser que se combinen los inhibidores de GSK-3 con otros compuestos (Chiu et al., 2011, Scheuing et al., 2014) como la rapamicina que estimula la autofagia, contrarrestando con la disminución de la autofagia que se ha descrito por la inhibición de GSK-3 (Sarkar et al., 2008). Sin embargo, la razón principal por la que la inhibición de GSK-3 no muestra un efecto beneficioso claro por sí mismo en modelos de ratón de EH puede ser porque los niveles y la actividad de GSK-3 puede que no estén incrementadas en la EH. De hecho, nosotros y otros hemos reportado previamente un incremento en la fosforilación en la serina N-terminal de GSK-3 en el estriado y otras regiones cerebrales de varios modelos de ratón de EH (Saavedra et al., 2010, Blum et al., 2014, Lim et al., 2014) y aunque no hay datos disponibles en lo que se refiere al estriado de muestras *post-mortem* procedentes de pacientes de EH, se ha reportado recientemente que en el córtex frontal de cerebro procedente de pacientes de EH el nivel de GSK-3 β está disminuido (Lim et al., 2014). En la línea con la noción de que una disminución de la actividad GSK-3 en el estriado podría contribuir a la EH, el ratón transgénico con expresión en cerebro anterior de una forma dominante negativa de GSK-3 muestra un incremento de la apoptosis neuronal en el estriado y también déficits motores en tareas dependientes del estriado, mostrando así un fenotipo similar a la EH (Gomez-Sintes et al., 2007, Gomez-Sintes and Lucas, 2013).

3. TAU

3.1. Descripción

Como se ha mencionado, Tau es una proteína asociada a microtúbulos (MAP) (Goedert and Spillantini, 2006) y que se encuentra en elevados niveles en el cerebro humano adulto destacando en la corteza, el hipocampo, el tálamo, el estriado y, en menor medida en el cerebelo (Goedert et al., 1989a, Trojanowski et al., 1989). Dentro de las neuronas se encuentra en el citoplasma donde está concentrada en los axones (Binder et al., 1985) pero también está presente en las dendritas (Ittner et al., 2010). También se puede encontrar asociada a la membrana plasmática (Brandt et al., 1995, Arrasate et al., 2000) y en el interior del núcleo (Lu et al., 2014).

Tau se une a los microtúbulos y los estabiliza. Éstos son estructuras tubulares de las células (25 nm de diámetro) formados por la polimerización de dímeros de α y β -tubulina, que se originan en los centros organizadores de microtúbulos (MTOC) y, que se extienden por el citoplasma formando parte del citoesqueleto. Constituyen los raíles por los que se desplazan las vesículas de secreción, los orgánulos, y participan en la división celular. Tau participa en el ensamblaje de dímeros de tubulina interaccionando con ésta a través de sus dominios de unión a microtúbulos estabilizando así la red microtubular. Estudios *in vitro* han demostrado que Tau inicia la nucleación de los microtúbulos (Drechsel et al., 1992). El estado de fosforilación de Tau también afecta a su habilidad para ensamblar microtúbulos como veremos más adelante.

Una función por tanto en la que Tau está implicada es en el transporte de moléculas de señalización, factores tróficos, mitocondrias o vesículas a lo largo del axón. (Ballatore et al., 2007, Vershinin et al., 2007). Pero no podemos descartar que Tau esté implicada en más funciones, debido a su capacidad de interaccionar con numerosas proteínas además de la tubulina, como la presinilina 1 (Takashima et al., 1998), la calmodulina (Padilla et al., 1990), la espectrina (Carrier et al., 1984), la actina (He et al., 2009) o fosfatasa como PP1, PP2A o PP2B (Gong et al., 1994) entre otras.

Pero el interés sobre la proteína Tau, no se debe tanto a sus funciones fisiológicas sino a su disfunción o alteración en numerosas enfermedades neurodegenerativas conocidas como tauopatías que explicaremos más adelante.

3.2. Gen que codifica la proteína Tau

El gen que codifica la proteína Tau, *MAPT*, está localizado en la región q21.31 del cromosoma 17 y contiene 16 exones (Neve et al., 1986, Andreadis et al., 1992) y, se aisló por primera vez a partir de una librería de ADN complementario de cerebro de ratón (Lee et al., 1988). Luego se clonó en otras especies incluido el humano (Goedert et al., 1989b). En el cerebro de un humano adulto sano, existen 6 isoformas de la proteína que se producen mediante *splicing* alternativo del gen (Andreadis, 2005). Estas isoformas difieren por la presencia o ausencia de un inserto de 29 o 58 aminoácidos en la región N-terminal de la proteína debido al *splicing* alternativo de los exones 2 y 3 y, por la inclusión o no de una repetición de 31 aminoácidos codificada por el exón 10 en la región C-terminal de la proteína. Centrándonos en esta última región, la inclusión del exón 10, da lugar a tres isoformas con cuatro repeticiones cada una (Tau-4R) y, su exclusión mediante *splicing* alternativo da lugar a tres isoformas con tres repeticiones cada una (Tau-3R). Las repeticiones constituyen los dominios de unión a microtúbulos de la proteína Tau (Goode and Feinstein, 1994, Gustke et al., 1994). Las isoformas de Tau con cuatro repeticiones se unen con mayor afinidad a los microtúbulos que las isoformas que contienen sólo tres repeticiones (Goedert and Jakes, 1990, Fauquant et al., 2011). La isoforma más larga del SNC contiene dos insertos y cuatro repeticiones mientras que la más corta no contiene insertos y sólo tiene tres repeticiones. Durante el desarrollo tanto de humanos como de ratones, sólo se expresa la forma más corta de Tau (Tau-3R sin inserto amino terminal) (Kosik et al., 1989, Brion et al., 1993), mientras que en el cerebro adulto de individuos sanos, hay cantidades iguales de las isoformas Tau-3R y Tau-4R (Goedert and Jakes, 1990) mientras que el ratón adulto, expresa predominantemente isoformas Tau-4R (Gotz et al., 1995).

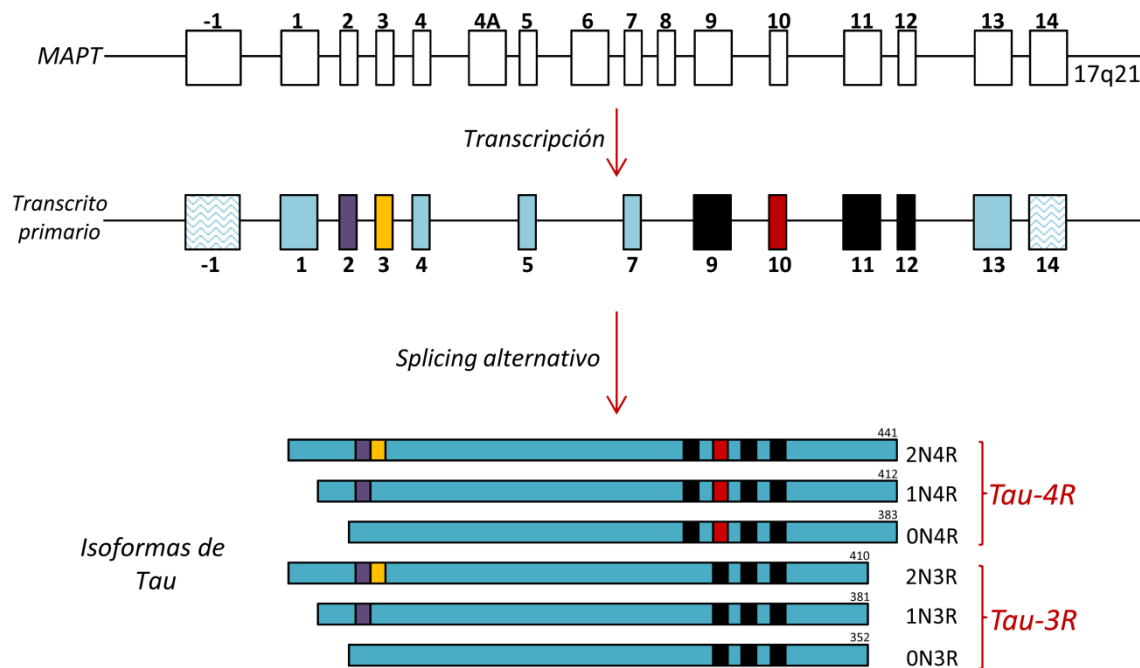


Figura 5: Esquema del gen MAPT y de las isoformas presentes en cerebro de un adulto sano mediante splicing alternativo. Representación esquemática del gen MAPT cuyo transcrito primario sufre splicing alternativo de los exones 2 y 3 y del exón 10 dando lugar a 6 isoformas de Tau cuyo tamaño varía en función del número de exones. La inclusión del exón 10 da lugar a las isoformas Tau-4R y, la exclusión del exón 10 da lugar a las isoformas Tau-3R.

3.3. Tauopatías

Las tauopatías son un grupo de enfermedades neurodegenerativas que se caracterizan porque la proteína Tau muestra un metabolismo alterado y se deposita en acúmulos (Lee et al., 2001b). Entre ellas se incluyen la Enfermedad de Alzheimer (EA), la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la degeneración corticobasal (CBD), la enfermedad de Pick (PiD), o la demencia frontotemporal con parkinsonismo asociado ligada al cromosoma 17 (FTDP-17) entre otras (Hernandez and Avila, 2007). En estas enfermedades, se puede observar que Tau cuando esta hiperfosforilado, se asocia formando filamentos pareados helicoidales (PHFs) y, éstos a su vez, ovillos neurofibrilares anormales (NFT) como es el caso de la EA. En otras tauopatías, la deposición de Tau tiene lugar en forma de polímeros aberrantes de fosfo-Tau, como en la FTDP-17 en forma de anillos perinucleares o en la PSP y la CBD en forma de inclusiones astrogliales o en la enfermedad de Pick en forma de cuerpos de Pick en el interior de las neuronas y, en algunos casos en astrocitos y oligodendrocitos (Buee et al., 2000, Lee et al., 2001a, Mandelkow et al., 2007) que puedan contribuir a la disfunción celular e inducir neurotoxicidad (Khlistunova et al., 2006).

En la mayoría de las enfermedades con agregados de Tau, ésta está hiperfosforilada como consecuencia del desbalance entre la actividad de las quinasas y las fosfatasas lo cual disminuye su capacidad de interaccionar con los microtúbulos (Bramblett et al., 1993, Yoshida and Ihara, 1993). Entre las quinasas que pueden fosforilar Tau además de GSK-3, tenemos CDK-5, JNK, PKA, PKC y CaMKII (Buee et al., 2000). GSK-3 es la que tiene capacidad de fosforilarla en más residuos, muchos de ellos presentes en los PHFs (Goedert et al., 1988, Hanger et al., 2009). Aunque la fosforilación de Tau no es estrictamente patogénica ya que también ocurre de forma reversible durante el desarrollo del cerebro fetal, la hibernación y la hipotermia (Goedert et al., 1993, Planel et al., 2004, Stieler et al., 2011).

En las diferentes tauopatías, las regiones cerebrales y tipos celulares, están afectados de forma diferencial. Estas diferencias están relacionadas con la composición en isoformas de los filamentos de Tau (Mailliot et al., 2000). En la EA, las seis isoformas están presentes en los ovillos neurofibrilares (Goedert et al., 1992) y el ratio entre las isoformas Tau-4R y Tau-3R es 1. En FTDP-17 con mutaciones en Tau, el contenido de isoformas del Tau agregado y la localización celular de los depósitos, varía dependiendo de la mutación (van Swieten, 2007). En otras tauopatías, el ratio Tau-4R/Tau-3R en las estructuras patológicas varía hacia el incremento de las isoformas Tau-4R como en la PSP (Arai et al., 2001, Zhukareva et al., 2006) y en la CBD (Arai et al., 2001) y en la enfermedad de los granos argirófilos (Fujino et al., 2005) o hacia el incremento de Tau-3R como en la PiD (Zhukareva et al., 2002) con diferente localización de las estructuras de Tau agregado en cada caso.

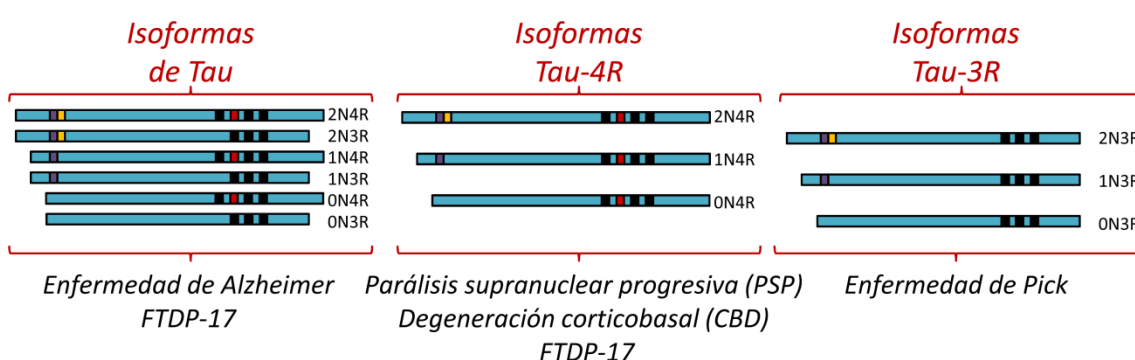


Figura 6: Representación esquemática de la composición en isoformas de Tau en diferentes enfermedades neurodegenerativas. En la enfermedad de Alzheimer y algunas familias de FTDP-17 podemos encontrar las seis isoformas de Tau. En PSP, CBD y familias con alguna mutación en el exón 10 o en el Intrón 10 muestran mayoritariamente isoformas Tau-4R. En la Enfermedad de Pick predominan las isoformas Tau-3R.

3.4. Alteración del *splicing* alternativo y neurodegeneración

El *splicing* alternativo es un mecanismo versátil y muy expandido para generar muchos ARNm de un único gen (Grabowski, 1998, Graveley, 2001). Como hemos mencionado anteriormente, el *splicing* alternativo de Tau en el exón 10 da lugar a isoformas Tau-3R y Tau-4R (Liu and Gong, 2008). El descubrimiento de mutaciones intrónicas y silenciosas en familias afectadas por FTDP-17 que aumentaban el ratio 4R/3R de las isoformas de Tau (Hutton et al., 1998) reveló que el desbalance en 4R-Tau y 3R-Tau en favor de las isoformas Tau-4R, era suficiente para causar neurodegeneración con cambios de personalidad, demencia y disfunciones motoras, un fenotipo muy similar al de la EH.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Análisis del nivel y la actividad de GSK-3 en el cerebro de pacientes de la Enfermedad de Huntington (EH) y en el ratón modelo de la enfermedad R6/1.
2. Si hay cambio, generación de un modelo de ratón de EH con incremento o disminución de GSK-3 transgénico para corregir el cambio observado.
3. Análisis del efecto de la modificación genética de GSK-3 en ratones de la EH.
 - Análisis bioquímico e histológico.
 - Análisis comportamentales.
4. Análisis del sustrato de GSK-3, Tau, en cerebro de pacientes de la EH y en ratones modelo de la enfermedad.
 - Nivel de Tau total y fosforilación.
 - Análisis de las isoformas de Tau y caracterización.
 - Análisis de las marcas histopatológicas de Tau en la EH.
5. Análisis del efecto de la reducción genética de Tau en el ratón modelo de la EH.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS DE TEJIDO CEREBRAL

1.1. Muestras de pacientes

Las muestras de corteza frontal, estriado e hipocampo de cerebro de pacientes de EH, de EA y controles, fueron suministradas por el Banco de Cerebros del Instituto de Neuropatología (HUB-ICO-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, España), el Banco de Tejidos Neurológicos del Biobanco IDIBAPS (Barcelona, España), el Banco de Tejidos Fundación Cien (BT-CIEN, Madrid, España) y el Banco de Cerebros de Holanda (Amsterdam, Holanda) con el correspondiente consentimiento informado por escrito por parte de los donantes de cerebro y/o familiares para la extracción después de la muerte para ser usado con propósitos de diagnóstico e investigación. Los procedimientos fueron aprobados por el Subcomité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, España). El intervalo de tiempo *post-mortem* (IPM) desde la muerte del paciente hasta la extracción de las muestras oscila entre 3:40 y 48 horas. El examen neuropatológico de los casos de la EH, reveló el diagnóstico de los grados de la EH siguiendo los criterios de Vonsattel (Vonsattel et al., 1985) que variaban de 0-1 a 4.

Tabla 2: Pacientes de Enfermedad de Huntington utilizados.

Código	Diagnóstico	Grado de Vonsattel	Número de repeticiones	Sexo	Edad	IPM	Experimento
CS0539	EH	3	44	H	68	4:00	3,4
BK-0387	EH	n/d	n/d	M	28	4:15	1, 2, 3
nhb 09-063	EH	4	n/d	M	64	5:00	4
CS1438	EH	3	40	H	85	5:30	4
BK 801	EH	3	44	H	59	5:30	1, 3, 4
nhb 03-047	EH	2/3	n/d	M	50	5:40	4
BC 1487	EH	n/d	n/d	M	75	6:00	2, 3
nhbm 010	EH	0/1	45	M	67	6:05	4
CS1294	EH	3	45+/-2	H	53	7:00	3, 4
CS1193	EH	3/4	n/d	H	55	7:00	3,4
CS1334	EH	1	40+/-2	H	73	7:00	4
BCPA 79	EH	n/d	n/d	H	62	7:00	2, 3, 4
BK 601	EH	3	n/d	M	72	7:00	3, 4
BK 413	EH	2	41	H	71	10:15	1, 3, 4
nhb 01-128	EH	2	n/d	H	61	10:25	4
BC 1546	EH	n/d	n/d	M	47	12:00	2, 3
BK-0909	EH	3	43	H	60	13:05	1, 2, 3, 4
CS1120	EH	3	48	H	55	15:00	4
BK 518	EH	3	42	M	65	15:15	1, 3, 4
BK 643	EH	3	42	M	72	17:00	1, 3, 4
CS0371	EH	3	n/d	H	55	23:00	4
BCPA 138	EH	n/d	n/d	H	43	n/d	4
BCPA 112	EH	n/d	n/d	M	53	n/d	4
BCPA 324	EH	n/d	n/d	H	55	n/d	4
BCPA 336	EH	n/d	n/d	M	62	n/d	4
BCPA 305	EH	n/d	n/d	H	n/a	n/d	4
BCPA 340	EH	n/d	n/d	H	n/a	n/d	4
BC 1294	EH	n/d	n/d	H	44	n/d	2, 3
BC 1371	EH	n/d	n/d	M	69	n/d	2, 3
BC 1562	EH	n/d	n/d	M	ND	n/d	2, 3

EH: Enfermedad de Huntington; IPM: intervalo post-mortem; H: Hombre; M: Mujer; n/d: no disponible.

Experimento: 1 Western blot; 2 RT-PCR; 3: Ensayo de actividad; 4 Inmunohistoquímica/Inmunofluorescencia.

Tabla 3: Pacientes de Enfermedad de Alzheimer utilizados.

Código	Diagnóstico	Estadio Braak NFT	Estadio Braak amiloide	Sexo	Edad	IPM	Experimento
S10-77	EA	3	C	M	78	n/d	4
S10-51	EA	4	C	M	90	n/d	4
S10-97	EA	4	C	M	92	n/d	4
S10-92	EA	2	B	M	78	n/d	4
S10-246	EA	3	n/d	H	69	n/d	4
S10-250	EA	3	C	M	82	n/d	4
S11-21	EA	1	B	M	85	n/d	4
S10-26	EA	1	A	M	86	n/d	4
S10-33	EA	1	A	H	70	n/d	4
S10-109	EA	1	0	M	60	n/d	4

EA: Enfermedad de Alzheimer; IPM: intervalo post-mortem; H: Hombre; M: Mujer; n/d: no disponible.

Experimento: 4 Inmunohistoquímica/Inmunofluorescencia.

Tabla 4: Controles utilizados.

Código	Diagnóstico	Neuropatología	Sexo	Edad	IPM	Experimento
BC 1549	Control	n/d	M	57	1:00	2, 3
A05-38	Control	n/d	H	78	2:15	1, 3
A07-148	Control	n/d	M	78	3:40	1, 3
CS0499	Control	Control	M	74	3:40	4
A08-39	Control	n/d	H	56	3:45	1, 2, 3
A08-23	Control	n/d	M	81	4:00	2, 3
A08-42	Control	n/d	M	64	5:00	1, 3
CS0352	Control	Cambios hipóxicos	M	70	5:00	4
A05-18	Control	n/d	H	85	5:45	1, 3
CS0380	Control	Control con pocas placas difusas	M	72	6:00	4
CS1378	Control	Demencia vascular y leucoencefalopatía multiinfarto	H	78	6:00	4
BC1325	Control	n/d	H	68	8:00	2, 3
A09-83	Control	n/d	H	60	8:10	1, 3
CS1201	Control	Dilatación ventricular + encefalopatía multiinfarto	M	74	8:25	4
A07-162	Control	n/d	M	71	8:30	1, 3
CS1468	Control	α -sinucleína Braak1 + NFT Braak2	H	64	10:00	4
CS0695	Control	Demencia vascular	H	80	10:00	4
A05-119	Control	n/d	H	71	12:00	1, 3
CS0320	Control	Control	M	37	13:30	4
A07-24	Control	n/d	M	60	15:30	1, 2, 3
CS0368	Control	Control con placas difusas de amiloide	H	76	17:00	4
BK-1074	Control	n/d	H	31	17:30	1, 2, 3
BC 1298	Control	n/d	H	79	19:00	2, 3
CS0358	Control	Cuerpos de Lewy aislados	M	77	23:00	4
BK-0810	Control	Control	M	81	23:30	1, 3, 4
nhbm 004	Control	n/d	M	39	<12:00	4
nhbm 005	Control	n/d	M	44	<12:00	4
nhbm 003	Control	n/d	H	55	<12:00	4
nhbm 008	Control	n/d	M	84	<12:00	4
nhbm 006	Control	n/d	H	96	<12:00	4
nhbm 009	Control	n/d	H	30	<24:00	4
CS0334	Control	Hipoxia cerebelar	H	53	<24:00	4
nhbm 007	Control	n/d	M	68	<24:00	4
nhbm 002	Control	n/d	M	83	<48:00	4
BC 1448	Control	n/d	H	56	n/d	2, 3
BC 1610	Control	n/d	M	58	n/d	2, 3
BCPA 177	Control	n/d	M	58	n/d	4
nhbm 001	Control	n/d	H	72	n/d	4
BCPA 343	Control	n/d	H	77	n/d	4

IPM: intervalo post-mortem; H: Hombre; M: Mujer; n/d: no disponible.

Experimento: 1 Western blot; 2 RT-PCR; 3: Ensayo de actividad; 4 Inmunohistoquímica/Inmunofluorescencia.

1.2. Modelos de animales utilizados

Todos los animales utilizados en esta tesis, se criaron en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Se estabularon cuatro ratones por caja con comida y agua *ad libitum* y, fueron mantenidos en un ambiente con la temperatura controlada con ciclos luz-oscuridad 12/12h con luz desde las 07:00 h. El mantenimiento de los animales se realizó siguiendo la guía del Council of Europe Convention ETS123, revisada como indica en la Directive 86/609/EEC. Los experimentos con animales se realizaron bajo los protocolos (P15/P16/P18/P22) aprobados por el Comité de Cuidado y Utilización Animal del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Comité de Ética de Experimentación Animal del CBM, CEEA-CBM), Madrid, España. Se utilizaron ratones R6/1 transgénicos para el exón 1 del gen de la Htt humana (Mangiarini et al., 1996), el ratón transgénico condicional modelo de la EH HD94 (Yamamoto et al., 2000), el ratón transgénico de sobreexpresión de GSK-3 previamente generado en el laboratorio (Lucas et al., 2001) y un modelo de ratón deficiente para la proteína Tau (Dawson et al., 2001).

1.2.1. Modelo transgénico de la Enfermedad de Huntington R6/1

Este ratón fue generado mediante la inserción en el genoma del animal de un fragmento N-terminal que contiene la región 5'UTR, el exón 1 con una expansión de 116 tripletes CAG y, las primeras 262 pares de bases del intrón 1 del gen de la HTT humana. Se expresa de forma ubicua bajo control del promotor de la *HTT* humana. Este ratón presenta un fenotipo neurológico progresivo y severo similar a muchos de los síntomas que presentan los pacientes de la EH (Mangiarini et al., 1996).

1.2.2. Modelo transgénico condicional de la Enfermedad de Huntington HD94

Este ratón se generó utilizando el sistema génico de respuesta a la tetraciclina. Este sistema consiste en cruzar ratones procedentes de la línea transgénica tTA, en el que la expresión del transactivador regulado por tetraciclina tTA, que es una proteína de fusión que contiene el dominio de unión al ADN del represor de la tetraciclina y, el dominio de activación VP16 del virus Herpes simple, se expresa bajo el control del promotor calcio/calmodulina quinasa II α (CamKII α -tTA) y, por tanto en sistema nervioso central y más específicamente en cerebro anterior (Mayford et al., 1996, Yamamoto et al., 2000), con el ratón transgénico que

contiene el promotor de respuesta bidireccional BitetO seguido por la secuencia quimera del exón 1 del gen de la Htt de ratón y de humano, con una expansión poli-Q de 94 repeticiones en una dirección y, la secuencia del gen reportero de la β -Galactosidasa (LacZ) en la otra dirección. Cuando ambos ratones se cruzan, dan lugar a una progenie doble transgénica designada HD94 que expresa constitutivamente ambos transgenes y que sin embargo, esta expresión puede ser abolida en presencia de la doxyciclina (análogo de la tetraciclina). El fenotipo de estos ratones es consistente con los pacientes de la EH: una disminución en el tamaño del estriado, presencia de agregados intra y extranucleares de HTT mutada y, disminución en los niveles del receptor D1 (Yamamoto et al., 2000).

Generación del ratón HD94

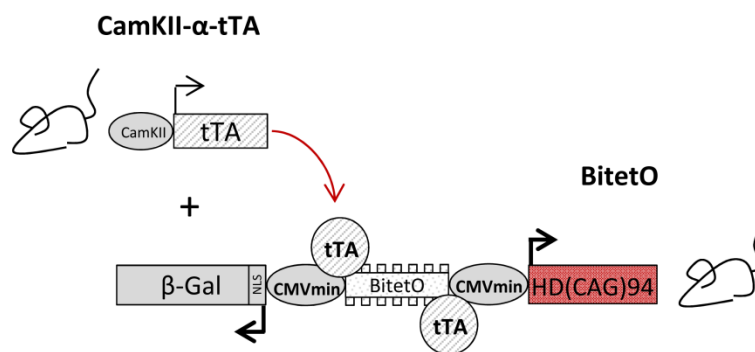


Figura 7: Generación del ratón doble transgénico HD94.

1.2.3. Modelo transgénico de sobreexpresión de GSK-3

Debido a que se ha descrito que la sobreexpresión de GSK-3 β produce letalidad embrionaria (Brownlee et al., 1997), para generar un ratón transgénico de sobreexpresión de GSK-3 se utilizó, al igual que en el caso anterior, el sistema inducible regulado por la tetraciclina. Se cruzaron los ratones CamKII α -tTA (Mayford et al., 1996, Yamamoto et al., 2000), con el ratón previamente generado en el laboratorio BitetO-GSK-3 que contiene una secuencia bidireccional operadora de respuesta a tTA combinada con el promotor mínimo de Citomegalovirus y, a uno de los lados la secuencia del transgén GSK-3 β y, al otro lado la secuencia del transgén reportero de la β -Galactosidasa (LacZ) con una señal de localización nuclear (Lucas et al., 2001). Como resultante del cruce de ambos ratones, se genera un ratón transgénico que expresa tTA bajo el control del promotor CamKII α y que se une con gran afinidad a la secuencia BitetO favoreciendo la expresión continuada de GSK-3 β y β -Galactosidasa en ausencia de tetraciclina (Lucas et al., 2001).

Generación del ratón de sobreexpresión de GSK-3

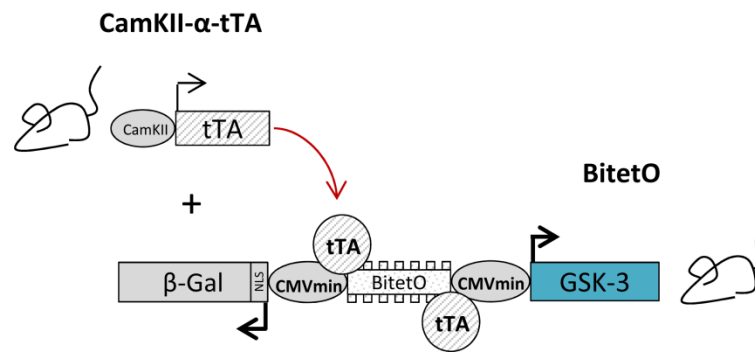


Figura 8: Generación del ratón doble transgénico de sobreexpresión de GSK-3.

1.2.4. Modelo knockout de Tau

Este modelo de ratón, se generó mediante la interrupción funcional del gen *Mapt* del ratón reemplazando el exón 1 que contiene las señales de inicio de la traducción de la proteína Tau, con el cassette de resistencia al análogo de la neomicina G418, de este modo se obtiene un ratón carente de la proteína Tau (Dawson et al., 2001).

1.3. Genotipado de los animales

1.3.1. Obtención de ADN genómico

Para extraer ADN genómico de los animales, se cortó un trozo de cola de cada ratón y, se lisaron mediante la incubación de éstas en tampón de lisis (Tris H-Cl 100 mM pH 7,8, EDTA 5 mM pH 8, SDS 0,1%, NaCl 200 mM en H₂O) más 2 µl de proteinasa K (Merck) a 60°C hasta su completa degradación. A continuación se extrajo el ADN mediante adición de NaCl 6M a cada lisado. Se centrifugó 10 min a 13200 rpm y al sobrenadante se le añadió isopropanol y se invirtió el tubo hasta la visualización de hebras blancas. Seguidamente, se volvió a centrifugar 10 min a 13200 rpm y al pellet se le añadió etanol al 70%. Se centrifugó 2 min a 13200 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet donde tenemos el ADN de cada animal. Finalmente resuspendimos el ADN en agua.

1.3.2. Amplificación de ADN genómico y genotipado

Para amplificar el ADN mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis and Faloona, 1987) se utilizó un termociclador. El volumen de reacción fue 50 µL para los

oligonucleótidos cebadores A, B, C, F, MT In 1.1F, NEO 2 y MT Ex 1R y 12 µL para los cebadores 92 y 96. Se utilizó 1 U de polimerasa del kit comercial Go-Taq^R Flexi DNA polymerase (Promega) por mezcla de reacción. Como iniciadores de la elongación se emplearon los diferentes cebadores sintéticos descritos en la tabla 5 a una concentración final en la mezcla de reacción de 1 µg/µL. El protocolo de amplificación varía dependiendo el par de cebadores utilizados para el genotipado de cada uno de los tipos de animal descritos en la tabla.

Tabla 5: Secuencia de oligonucleótidos utilizados y protocolo de amplificación para el genotipado de los animales.

Animal genotipado	Nombre del oligonucleótido	Secuencia de oligonucleótido	Protocolo de amplificación		
R6/1	92 (Directo)	5'-TGG GAC GCA AGG CGC CGT G-3'	(1) 94°C 3 min	(35) 94°C 30seg 64°C 1 min 72°C 1 min	(1) 72°C 2 min
	96 (Reverso)	5'-TGG AAG GAC TTG AGG GAC TC-3'			
tTA	C (Directo)	5'-ACT AAG TCA TCG CGA TGG AGC-3'	(1) 94°C 5min	(29) 94°C 1min 53°C 1min 72°C 90seg	(1) 72°C 5min
	F (Reverso)	5'-CGA AAT CGT CTA GCG CGT CGG-3'			
BitetO	A (Directo)	5'-CAT GGT CAG GTC ATG GAT GAC C-3'	(1) 94°C 5min	(30) 94°C 40seg 62°C 90seg 72°C 90 seg	(1) 72°C 5min
	B (Reverso)	5'-TAA TCA GCC ACT GAT CCA CCC AG-3'			
Tau	MT In 1.1F	5'-TTG AAT CTC TCC CTG GAC ATG G-3'	(1) 94°C 3 min	(35) 94°C 30seg 60°C 30seg 72°C 1 min	(1) 72°C 10min
	NEO 2	5'-CTT CTA TCG CCT TCT TGA CGA G-3'			
	MT Ex 1R	5'-TTG TGT CAA ACT CCT GGC GAG-3'			

2. TÉCNICAS EMPLEADAS

2.1. Análisis de nivel ARN mediante RT-PCR cuantitativa

Se extrajo ARN total del estriado y de la corteza de pacientes de EH y de controles y, de la corteza, el estriado y el hipocampo de ratones, utilizando el Kit Maxwell[®] 16 LEV simplyRNA para tejido (Promega). El ARN total resultante (750 ng) se usó para la síntesis de cDNA con el kit Super Script III First-Strand Synthesis SuperMix de Invitrogene (PN 11752250) con el siguiente protocolo de amplificación: 30'' a 95°C + (5'' a 95°C + 5'' a 60°C) x 40 ciclos + (5'' a 60°C + 5'' a 95°C). La cuantificación se realizó mediante PCR a tiempo real usando el Sistema CFX 384 (Bio-Rad) combinado con SsoFast Eva Green (Bio-Rad) siguiendo el protocolo del fabricante y usando 1 µL de cada pareja de oligonucleótidos. Los datos se analizaron usando el *software* GenEx 5.3.7 (Multid AnaLyses AB).

2.1.1. RT-PCR relativa

Los niveles de ARNm fueron normalizados primero respecto a la cantidad total de ARN y después, en el caso de las muestras procedentes de humanos, respecto a los niveles de expresión del gen que codifica la subunidad 18S del ribosoma para cada muestra y, en el caso de las muestras procedentes de ratones, a la media de la expresión de los genes de la subunidad 18S del ribosoma, GAPDH, β -actina y β -tubulina para cada muestra. Los resultados están expresados de forma relativa a la media del grupo control.

2.1.2. RT-PCR absoluta

En las muestras procedentes de pacientes, para determinar el ratio 4R/3R de las isoformas de Tau en cada muestra, tuvimos que cuantificar exactamente la cantidad de ARN Tau-4R, Tau-3R y Tau total. Para ello se obtuvieron los amplicones para Tau-4R, Tau-3R y Tau total y, fueron insertados en el plásmido pMA-T suministrado por GeneART[®] (Life technologies). Este plásmido pMA-T-Total Tau_4R Tau_3R Tau, que contenía una copia de cada amplicón mencionado, fue digerido con el enzima de restricción *Ascl* y, se hicieron diluciones seriadas para generar una curva de calibración de modo que con esta curva, podíamos determinar exactamente el contenido de Tau-4R, Tau-3R y Tau total para cada muestra. Como se esperaba, la eficiencia de la reacción de PCR y la curva de fusión para cada pareja de

cebadores, era la misma usando el plásmido standard pMA-T-Total Tau_4R Tau_3R Tau o las muestras de ARN humanas.

2.1.3. Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos para PCR usados para humano fueron:

<i>Humano</i>		
<i>Transgén</i>	<i>Oligonucleótido</i>	<i>Secuencia</i>
GSK-3α	Directo	5' GTCTCCTACATCTGTTCTCGCTA 3'
	Reverso	5' CAGCCAGCTGACCAAACAT 3'
GSK-3β	Directo	5' GAAAGTATTGCAGGACAAGAGAT 3'
	Reverso	5' CGGACTATGTTACAGTGATCTAG 3'
Tau total	Directo	5' AGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTC 3'
	Reverso	5' GGGTTTCAATCTTTTATTTCTCC 3'
Tau-4R	Directo	5' GGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGA 3'
	Reverso	5' GTGTTTGATATTATCCTTTGAGCCAC 3'
Tau-3R	Directo	5' GAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGG 3'
	Reverso	5' GACTATTTGCACCTTCCCGC 3'

Los oligonucleótidos para PCR usados para ratón fueron:

<i>Ratón</i>		
<i>Transgén</i>	<i>Oligonucleótidos</i>	<i>Secuencia</i>
GSK-3α	Directo	5' GAGCCACAGATTACACCTCGT 3'
	Reverso	5' CTGGCCGAGAAGTAGCTCAG 3'
GSK-3β	Directo	5' GGCAGCAAGGTAACCACAGT 3'
	Reverso	5' GATGGCAACCAGTTCTCCAG 3'
GSK-3β transgénica	Directo	5' TGCCACCGAGATATCAAACC 3'
	Reverso	5' TCGCACAGCTTGAGTACAGC 3'
GSK-3β total (endógena + transgénica)	Directo	5' ATAAAGATGGCAGCAAGG 3'
	Reverso	5' ACCACACCAATGATCC 3'
Tau total	Directo	5' AGGGAACATCCATCACAAGC 3'
	Reverso	5' TGGACTCTGTCCTGAAGTCC 3'
Tau-4R	Directo	5' TGTCAGGTCGAAGATTGGCTC 3'
	Reverso	5' CTTATTAATTATCTGCACCTTGCCAC 3'
Tau-3R	Directo	5' GTCAGGTCGAAGATTGGCTCTACT 3'
	Reverso	5' GTCTGTAGACTATTTGCACCTTGC 3'

2.2. Análisis del nivel de proteína mediante electrotransferencia e inmunodetección (*Western blot*)

Las diferentes regiones del cerebro de humanos que estaban guardadas a -80°C , fueron pulverizadas en un mortero evitando su descongelación con ayuda de nitrógeno líquido generando un ambiente helado. En el caso de los ratones, se extrajo el cerebro y, el hemisferio derecho se diseccionó rápidamente en sus diferentes estructuras cerebrales sobre una placa fría. Los extractos fueron preparados mediante la homogenización de las diferentes áreas cerebrales en tampón de homogenización frío compuesto por HEPES 20 mM pH 7.4, NaCl 100mM, NaF 20 mM, Tritón x-100 1%, ortovanadato de sodio 1mM, ácido okadaico 1 μM , pirofosfato de sodio 5 mM, β -glicerofosfato 30 mM, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$ y pepstatina 10 $\mu\text{g/ml}$). Se centrifugaron a 13200 rpm durante 15 min a 4°C . El sobrenadante resultante fue recogido y se determinó el contenido de proteína mediante el método Bradford (Biorad Protein Assay, Biorad). Para la electroforesis se cogieron 15 microgramos del total de proteína y se corrieron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%. Fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Seguidamente se bloquearon en TBS-T (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, Tween 20 0.05%) con leche al 5% o BSA al 5% dependiendo del anticuerpo que se fuera a utilizar. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario a 4°C durante la noche en TBS-T complementado con leche al 5% o BSA al 5%. Seguidamente se lavaron y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugada con HRP (P0447 de DAKO Cytomation) o anti-IgG de conejo conjugada con HRP (P0448 de DAKO Cytomation). El revelado posterior se realizó usando el kit ECL de detección (Perkin Elmer).

2.3. Ensayo de actividad enzimática GSK-3

Para determinar el nivel de actividad enzimática GSK-3 de las diferentes estructuras cerebrales, se cogió el tejido previamente pulverizado como hemos descrito anteriormente y, se homogenizó en buffer específico para el ensayo de actividad quinasa compuesto por HEPES 20 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, NaF 10 mM, Ov_4Na 1 mM, Triton 100-X 1%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$ y pepstatina 10 $\mu\text{g/ml}$, Roche). A continuación, las muestras se centrifugaron a 14000 g durante 15 min y se recogió el sobrenadante. Como sustrato de la reacción usamos el péptido GS1 (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQS*EDEE) el cual tiene la serina 21 fosforilada (Stambolic

and Woodgett, 1994). Los sobrenadantes fueron incubados a 37°C con el péptido GS1 y [γ - 32 P]ATP en Tris-HCl 25 mM pH 7.5, DTT 1 mM, MgCl₂ 10 mM y DMSO 10% o el inhibidor selectivo de GSK-3 AR-A014418 100 μ M. Las reacciones se detuvieron depositando las alícuotas en papel de fosfocelulosa P81 como se ha descrito previamente (Engel et al., 2006b). La actividad GSK-3 se obtuvo calculando la diferencia entre la actividad en presencia del inhibidor de GSK-3 AR-A014418 y la actividad en presencia de DMSO.

2.4. Análisis histológico de los tejidos

2.4.1. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

En el caso de los pacientes de EH, EA y sus respectivos controles, las secciones se obtuvieron de los diferentes bancos de tejidos seccionadas y preparadas sobre portaobjetos para trabajar con ellas después de desparafinarlas mediante el tratamiento con xileno e hidratación con baños de etanol de diferentes porcentajes. En el caso de los ratones, el hemisferio izquierdo del cerebro previamente extraído fue utilizado para procesarlo para histología. Para ello, lo pusimos en paraformaldehído al 4% preparado en el tampón fosfato Sorensen durante la noche y, al día siguiente, tras lavarlos en PBS, los sumergimos en sacarosa al 30% en PBS durante 72 h. Una vez crioprotegido, las muestras fueron incluidas en medio OCT (Sakura Finetek Europe), congeladas y guardadas a -80°C hasta su uso. Cortamos secciones sagitales de 30 μ m en el criostato y las guardamos en flotación en tampón glicol (glicerol 30%, glicol etileno 30% en tampón fosfato 0,02M) a -20°C. Tanto para las muestras humanas como las de los ratones, las secciones fueron incubadas con H₂O₂ al 0.3% en metanol durante 30 min para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Algunos anticuerpos requirieron un tratamiento previo al bloqueo para hacer un desenmascaramiento de epítomos con solución de Citrato de Sodio (Ácido Cítrico 1.92g/L en agua destilada pH5.9). Para la tinción inmunohistoquímica, las secciones se bloquearon en PBS con Suero Bovino Fetal al 0.5%, Triton X-100 0.3% y BSA al 1% (Sigma-Aldrich) durante 1 hora. Las secciones se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario en buffer de bloqueo durante la noche a 4°C. Finalmente, las secciones cerebrales se incubaron con el complejo avidina-biotina usando el kit Elite Vectastain (Vector Laboratories). El revelado se realizó con diaminobencidina (SIGMAFASTTM DAB, Sigma) durante 10 min. Las secciones se montaron en portaobjetos y cubreobjetos con Mowiol (Calbiochem). Las imágenes se tomaron usando un microscopio Olympus BX41 con una cámara DP-70 (Olympus Denmark A/S).

Para la inmunofluorescencia, las secciones fueron pretratadas con Tritón X-100 0.1% durante 15 min, Glicina 1M durante 30 min, y solución de bloqueo (BSA 1% y Triton X-100 0.1%) durante 1 hora. Las secciones se incubaron durante la noche a 4°C con los correspondientes anticuerpos primarios en solución de bloqueo. Al día siguiente, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con el complejo avidina-biotina usando el kit Elite Vectastain (Vector Laboratories) durante 1 hora y después, las secciones se incubaron con Streptavidina-Alexa 488 (Invitrogen) y anticuerpo secundario anti-conejo Alexa (Invitrogen) durante 1 hora. Los núcleos fueron contra-teñidos con DAPI (Calbiochem). Finalmente, las secciones se incubaron con Sudan Black durante 10 min y se montaron en portaobjetos con medio DePeX (Serva) y se mantuvieron a 4°C. Las imágenes se adquirieron con Sistema de laser confocal LSM710 acoplado a un microscopio invertido con objetivo de aceite de inmersión 63x y apertura numérica 1.4 usando el software Zen2010B sp1 software (Carl Zeiss). Las imágenes se procesaron usando el programa ImageJ 1.45s.

2.4.2. Microscopía electrónica

Para la microscopía electrónica secciones procedentes de corteza de humanos, se tiñeron por inmunohistoquímica con DAB con el anticuerpo HT-7 (MN1000 de Thermo Scientific). Brevemente, las secciones se post-fijaron con 2% OsO₄ durante 1 h, se deshidrataron, y se embebieron en Araldita y se montaron en plano en placas recubiertas por Formvar. Después de la polimerización, las áreas seleccionadas fueron fotografiadas, recortadas y re-embebidas en Araldita y reseccionadas a 1 µm. Estas secciones semifinas se fotografiaron y se reseccionaron en secciones ultrafinas de 100 nm. Las secciones ultrafinas fueron observadas en un microscopio de transmisión electrónico Jen 2010 Joel (Peabody), sin tinción con metales pesados para evitar precipitados artefactuales.

2.5. Cultivo celular

La línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y fue crecida en medio DMEM, suero bovino fetal al 10% y antibióticos. Las células se transfectaron usando Lipofectamine 2000 (Life Technologies) de acuerdo al protocolo del fabricante. Las construcciones de HTT se componen de pEGFP-1 con el fragmento N-terminal de Htt con 17 o 72 repeticiones de CAG fusionada con GFP (proporcionada por el Dr. Finkbeiner y la Dra. Arrasate). El vector de expresión SRSF6 fue suministrado por el Dr. Krainer.

2.6. Extracción de la fracción insoluble en Sarkosyl

Las muestras procedentes de la corteza frontal de un caso de EA (usado como control positivo de una tauopatía 3R-4R), de EH y de sujetos control (1 g) fueron homogenizadas en 10 volúmenes (p/v) de buffer de homogenización frío que consiste en 10 mM Tris-HCl (pH =7.4), 0.8 M NaCl, 1 mM EGTA, sacarosa al 10%, 0.1 mM fenilmethilsulfonil fluoruro, 2 Ag/ml aprotinina, 10 Ag/ml leupeptina, y 5 Ag/ml pepstatina. Los homogenados fueron primero centrifugados a 20000g, y el sobrenadante (S1) fue reservado. El pellet (P1) fue rehomogenizado en 5 volúmenes de buffer de homogenización y recentrifugado. Los dos sobrenadantes (S1 + S2) fueron mezclados e incubados con N-lauroylsarcosinato 10% durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 h a 100000g en un rotor Ti 70 Beckman. Los pellets insolubles en Sarkosyl (P3) fueron resuspendidos (0.2 ml/g del material de partida) en 50 mM Tris-HCl (pH = 7.4). La concentración de proteínas fue determinada con el método de Bradford. En geles de electroforesis (SDS-PAGE) 10% sulfato-poliacrilamida de sodio, se cargaron 50 µg de proteína en cada línea con tampón de carga (0.125 M Tris (pH = 6.8), 20% glicerol, 10% mercaptoetanol, 4% SDS, and 0.002% bromofenol blue). Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min antes de cargarlas al gel. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham) usando un sistema de cámara electroforética (Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad). Los sitios de unión no específicas se bloquearon con tampón Tris salino pH = 7.4 con 0.1% Tween-20 (TBST) conteniendo leche al 5% durante 30 min, e incubadas con cada uno de los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavarlas, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario marcado con la peroxidasa de rábano (Dako) diluida 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente, lavada otra vez y revelada con el sistema quimioluminiscente *ECL Western Blotting system* (Amersham). Las membranas luego se expusieron con películas autorradiográficas (Hyperfilm ECL, Amersham).

2.7. Coinmunoprecipitación

Extractos procedentes de estriados humanos (control y EH) fueron preacclarados y luego incubados con la Extactacruz matrix B usando el anticuerpo anti-Huntingtina N-18 (8767 de Santa Cruz Biotechnology). La matriz fue lavada tres veces usando el tampón de lisis y hervidas. A continuación se realizó el Western blot.

2.8. Cuantificación estereológica del volumen cerebral y de los agregados de Huntingtina

Se realizó inmunohistoquímica con los anticuerpos primarios anti-DARPP32 1:1000 (611520 de BD Bioscience) o anti-EM48 1:100 (MAB5374 de Millipore), siguiendo el protocolo previamente descrito (Giralt et al., 2010). Para la estimación del volumen cortical, estriatal e hipocampal, se cogieron 12 secciones sagitales por animal espaciadas entre sí 240 μ m. El conteo se hizo a ciegas respecto al genotipo utilizando el software Computer-Assisted Stereology Toolbox (CAST) (Olympus Danmark A/S, Ballerup, Denmark). La cuantificación automatizada del número y, del tamaño de los agregados de HTT en el estriado, se realizó usando el software CellProfiler v2.8. Se seleccionaron 5 secciones sagitales por animal espaciadas para el análisis. Las imágenes del estriado al completo se adquirieron con un objetivo 20x y, la tinción con EM48 se utilizó para identificar las inclusiones nucleares y delimitar su área.

2.9. Anticuerpos utilizados

Nombre	Especie	Epítipo	Dilución WB	Dilución IHQ	Dilución IF
β -Actina (AC74)	Ratón	Sigma	1:4000		
β -Galactosidasa	Conejo	Promega		1:2000	1:2000
Caspasa 3 activa	Conejo	Cell Signaling		1:50	
DARPP-32	Ratón	BD Biosciences		1:1000	
Huntingtin (EM48)	Ratón	Millipore		1:100	1:100
GADPH	Ratón	Abcam	1:1000		
GSK-3 β	Ratón	Cell Signaling			1:500
GSK-3 α/β	Ratón	Invitrogen	1:1000		
p-GSK-3 α/β	Conejo	Cell Signaling	1:1000		
SRSF6	Conejo	LS Bio	1:2000	1:500	1:500
P-SR (1H4)	Ratón	Millipore	1:1000		
Tau-3R (RD3-8E6/C11)	Ratón	Millipore	1:1000	1:2000	
Tau-4R (RD4-1E1/A6)	Ratón	Millipore	1:1000	1:80	
Tau-5	Ratón	Calbiochem	1:1000	1:200	
Tau-5E2	Ratón	Millipore	1:1000		
p-Tau 422	Ratón	Calbiochem	1:1000		
P-Tau PHF1	Ratón	Dr Peter Davies	1:1000		
p-Tau AT8	Ratón	Thermo Scientific	1:1000		
7.51 (Tau total)	Ratón	Dr M.Novak	1:1000		
HT7 (Tau total)	Ratón	Thermo Scientific		1:200	1:50
Tau oligomérico T22	Conejo	Dr. Rakez Kaye		1:100	
Ubiquitina	Conejo	Dako			1:200

3. ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DEL FENOTIPO DE LOS RATONES

Para el análisis de la evolución del fenotipo de los animales generados se midió la evolución del peso corporal y se realizaron diferentes pruebas de comportamiento para evaluar diferentes comportamientos de los animales. En estos análisis, se utilizaron indistintamente machos y hembras en los experimentos.

3.1. Peso Corporal

Los ratones fueron pesados cada 2 semanas desde el primer mes de edad hasta la muerte del último ratón relevante para el estudio.

3.2. Test de locomoción en campo abierto (*Open Field Locomotion*)

La actividad locomotora se midió en cajas transparentes de plexiglás (43.2 cm x 43.2 cm), equipadas con unos células fotoeléctricas que monitorizan tanto la actividad horizontal como la actividad vertical de los animales. Los niveles de actividad se registraron en un ordenador y se analizaron mediante el software MED Associates' Activity Monitor Data Analysis. Para llevar a cabo esta prueba, los animales se sitúan en una esquina de la caja y se les deja que se muevan libremente. Los parámetros que se miden incluyen: la distancia ambulatoria (cm) y las cuentas verticales. Los datos se recogen para cada animal durante 15 min.

3.3. Rotarod

Esta prueba se realizó con el aparato de Rotarod con aceleración (Ugo Basile). Se entrenaron los ratones durante dos días. El primer día, se pone al animal sobre un rodillo que gira a 4rpm a velocidad constante durante 1 minuto 4 veces y, el segundo día se programa para que el rodillo gire 2 minutos, el primero a 4 rpm y el segundo a 8 rpm 4 veces. El día de la prueba, el Rotarod se programa para que acelere de forma progresiva de 4 a 40 rpm en 5 min y, los ratones se testan 4 veces. Se mide el tiempo de latencia en que los ratones tardan en caer del rodillo.

3.4. Test de condicionamiento aversivo (*Contextual Fear conditioning test*)

El test se realizó utilizando el aparato Startfear 1.06 de Panlab. Durante el entrenamiento, se sitúa el ratón en la cámara durante 6:30 min. Después de 2 minutos de exploración, se emite un sonido de 85 dB durante 30 segundos y, en los dos últimos segundos del sonido, se les da un calambre a 0.2 mA (esto se repite 3 veces). Pasados 30 segundos del último shock, el ratón se saca y se devuelve a su jaula. 24 horas después de la sesión de condicionamiento, el ratón se introduce de nuevo en la misma cámara. El índice que se utiliza para cuantificar esta memoria condicionada al miedo que es dependiente de hipocampo es el *freezing*, que es el tiempo que el ratón está inmóvil (con total ausencia de movimiento excepto el debido a la respiración) ante el recuerdo del estímulo condicionante. Se cuantifica el tiempo de *freezing* durante 6 minutos en ausencia de tonos o calambres en la cámara donde sufrió el shock el día del entrenamiento.

4. ANÁLISIS DE DATOS

Los análisis estadísticos se realizaron usando SPSS 19.0 (SPSS® Statistic IBM®). Los datos se han representado como media +/- SEM. Para determinar la normalidad de los datos se utilizó el test Shapiro-Wilk. Para comprobar si existen diferencias significativas entre dos grupos ($p < 0.05$), se utilizó el test t-Student cuando los datos se distribuyen de forma normal (paramétricos) o el test U de Mann-Whitney cuando los datos no se distribuyen de manera normal (no paramétricos). Para comparaciones entre más de dos grupos, los datos que se distribuyen normalmente se analizaron con el test de ANOVA seguido por los test post-hoc DMS cuando las varianzas son iguales o el test post-hoc Games Howell cuando las varianzas no son iguales determinado mediante el test de Levene. El nivel de significancia mínimo aceptado ha sido $p < 0.05$. Cuando los grupos que queremos comparar no son paramétricos se analizaron con el test de Kruskal-Wallis seguido con el test U de Mann-Whitney para hacer las comparaciones entre dos grupos. En este último caso, se aplica la corrección de Bonferroni para determinar el nivel de significancia.

RESULTADOS

1. Análisis del nivel y la actividad de GSK-3 en el cerebro de pacientes y en un modelo de ratón de la Enfermedad de Huntington

1.1. Disminución del nivel y de la actividad GSK-3 en cerebro de pacientes de la Enfermedad de Huntington

Con el fin de elucidar el estado de GSK-3 en el cerebro de los pacientes de la EH, en primer lugar exploramos mediante *Western blot* los niveles de GSK-3 en muestras de estriado, corteza e hipocampo procedentes de controles y de pacientes de la EH. Observamos que los niveles de GSK-3, están dramáticamente disminuidos en el estriado ($p=0.034$) y en la corteza ($p=0.003$) de los pacientes de EH comparados con los controles, mientras que, en el hipocampo sólo podemos ver una tendencia a disminuir (Figura 9).

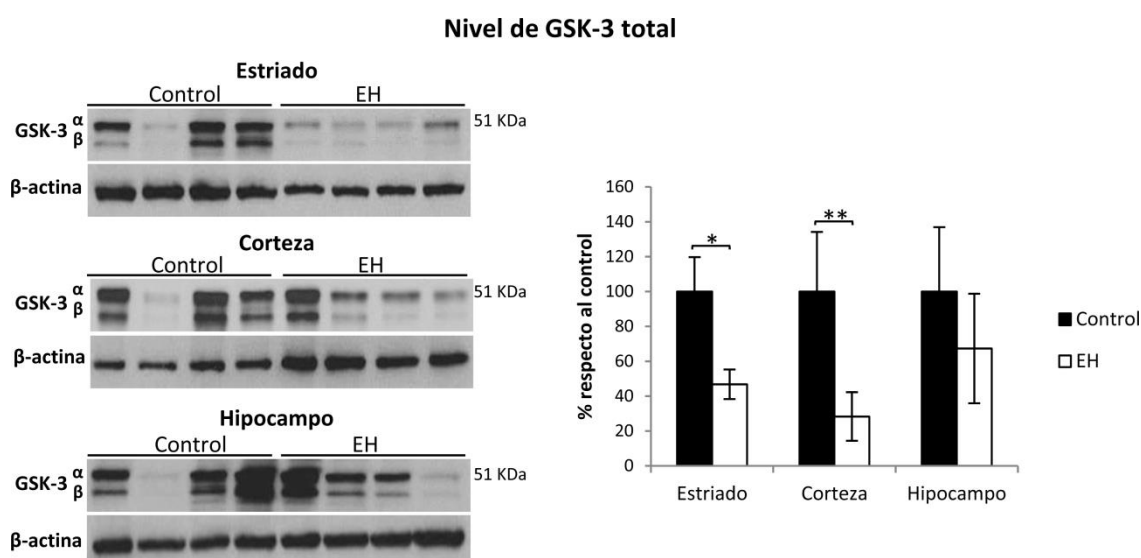


Figura 9: Disminución del nivel de GSK-3 en el estriado, la corteza y el hipocampo de pacientes de la EH. Detección mediante *Western blot* del nivel de GSK-3 α/β en homogenados de estriado, corteza e hipocampo de pacientes de EH y controles ($n=4$ para estriado, $n=11-10$ para corteza y $n=4$ para hipocampo; test t-Student, ** $p<0.01$).

Esta disminución del nivel de GSK-3 a nivel de proteína en pacientes de la EH, no es debida a una disminución de los niveles de ARNm de GSK-3 α y GSK-3 β como observamos mediante el análisis por RT-PCR cuantitativa relativa del ARNm extraído de cerebros de pacientes de la EH. Observamos que, los transcritos de GSK-3 α y de GSK-3 β , no disminuyen en pacientes de la EH. De hecho, pudimos ver una tendencia a incremento de los niveles del ARNm de GSK-3 α y GSK-3 β en corteza (Figura 10).

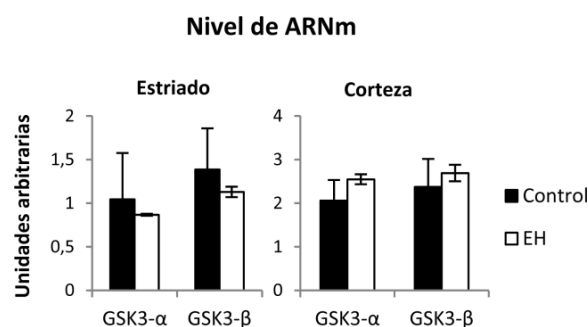


Figura 10: Niveles de ARNm de GSK-3α y GSK-3β en el estriado y en la corteza de pacientes de la EH. Análisis por RT-PCR cuantitativa relativa del ARNm de GSK-3α y GSK-3β en estriado y corteza de pacientes de EH y controles ($n=5-7$ para el estriado y $n=9-8$ para la corteza; sólo las muestras con número de integridad de ARN (RIN) por encima de 5 fueron incluidos en el análisis).

Puesto que los niveles de GSK-3 no son un indicador directo de su actividad, realizamos ensayos de actividad quinasa GSK-3 *in vitro* en homogenados de estriado, corteza e hipocampo de pacientes de la EH y controles, usando como sustrato de GSK-3 un péptido pre-fosforilado sintético. En concordancia con la disminución del nivel de GSK-3 observada a nivel de proteína, vimos una disminución significativa en la actividad de GSK-3 en el estriado (73.9%; $p=0.005$) y en la corteza (56.5%; $p=0.001$) de los pacientes de la EH comparado con los controles, mientras que, sólo vimos tendencia a que disminuya la actividad en el hipocampo (Figura 11).

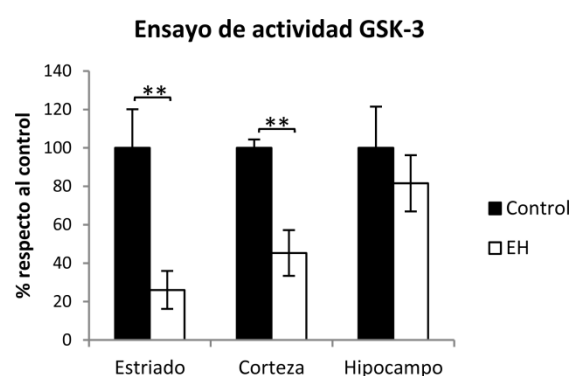


Figura 11: Disminución de la actividad de GSK-3 en el estriado, la corteza y el hipocampo de pacientes de la EH. Ensayo de actividad quinasa GSK-3 *in vitro*, realizado en homogenados de estriado, corteza e hipocampo de pacientes de la EH y sujetos control ($n=8$ para estriado, $n=10$ para corteza y $n=3-9$ para hipocampo, test t-Student; ** $p<0.01$).

Estos resultados indican que, el nivel y la actividad de GSK-3, están disminuidos en las partes del cerebro más afectadas por la enfermedad en los pacientes de la EH.

1.2. Disminución del nivel y la actividad de GSK-3 en el cerebro del ratón modelo de la Enfermedad de Huntington R6/1

A continuación, nos propusimos explorar si éramos capaces de reproducir los resultados previamente obtenidos en los pacientes de la EH, en el ratón modelo de la enfermedad R6/1. Para ello, analizamos el nivel y la actividad de GSK-3 en el estriado, corteza e hipocampo de estos ratones. Mediante *Western blot*, vimos que GSK-3 a nivel de proteína, está disminuida en el estriado ($p<0.0001$) y en la corteza ($p=0.006$) de ratones R6/1 en los primeros estadios de la enfermedad (3.5 meses) comparado con ratones WT. A medida que la enfermedad progresa, vimos que se produce una disminución similar del nivel de GSK-3 en el hipocampo de los ratones R6/1 pero sólo en estadios sintomáticos tardíos de la enfermedad (7 meses) (Figura 12).

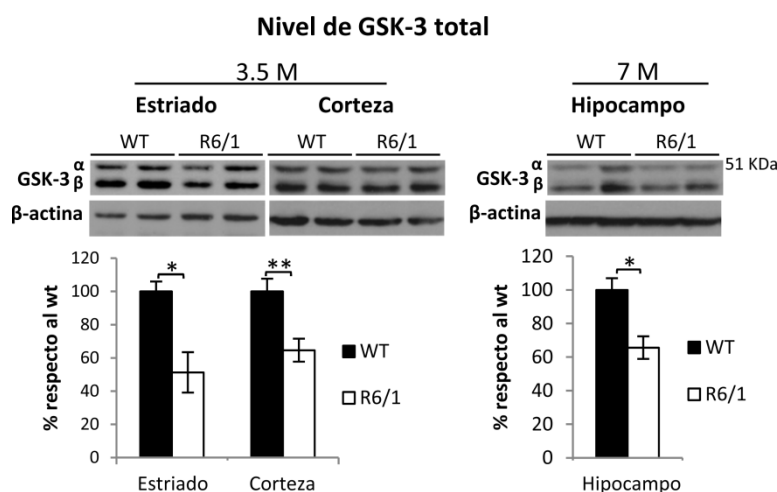


Figura 12: Disminución del nivel de GSK-3 en el estriado, corteza e hipocampo de los ratones R6/1. Detección mediante *Western blot* de los niveles de GSK-3 α/β en homogenados de estriado y corteza de ratones WT y R6/1 de 3.5 meses de edad y de hipocampo de ratones WT y R6/1 de 7 meses de edad ($n=7-6$ para estriado, $n=7-6$ para corteza y $n=6-7$ para hipocampo; test t-Student; * $p<0.05$, ** $p<0.01$).

De forma similar a lo que observamos en el cerebro de los pacientes de la EH, esta disminución en el nivel de proteína GSK-3, no es consecuencia de que se esté produciendo una bajada en la transcripción de los genes GSK-3 α y GSK-3 β , ya que no detectamos cambios significativos mediante RT-PCR cuantitativa relativa en los niveles de los respectivos ARNm en el estriado, en la corteza y en el hipocampo de los ratones R6/1 comparado con los ratones WT (Figura 13).

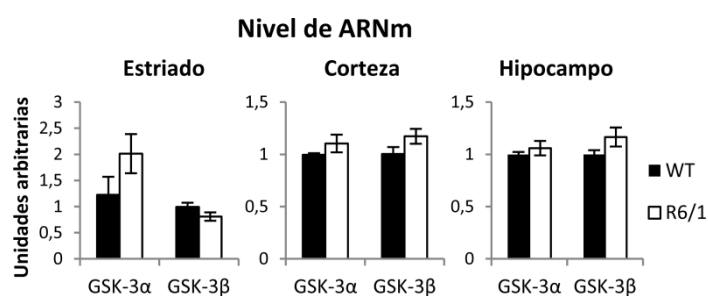


Figura 13: Niveles de ARNm de GSK-3α y GSK-3β en el estriado, corteza e hipocampo de los ratones R6/1. Análisis por RT-PCR cuantitativa relativa del ARNm de GSK-3α y GSK-3β en el estriado, corteza e hipocampo de ratones R6/1 de 9 meses de edad (n=5).

Como hemos mencionado anteriormente, una forma indirecta de explorar la actividad de GSK-3 en algunos de sus escenarios funcionales posibles, es analizando los niveles de fosforilación de GSK-3 en la serina 9 para GSK-3β y en la serina 21 para GSK-3α. Como ya estaba descrito (Saavedra et al., 2010, Lim et al., 2014), observamos un incremento significativo en los niveles de p-GSK-3 en el estriado ($p=0.019$), en la corteza ($p=0.002$) y en el hipocampo ($p=0.009$) de ratones R6/1 sintomáticos tardíos comparado con ratones WT (Figura 14) sugiriendo que se produce una disminución de la actividad de GSK-3 en el cerebro de los ratones R6/1.

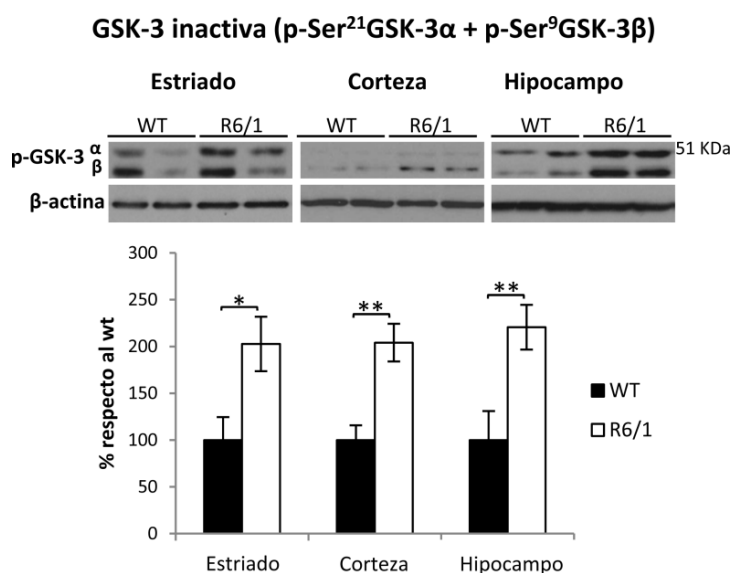


Figura 14: Niveles de fosforilación de GSK-3α/β en el estriado, la corteza y el hipocampo de los ratones R6/1. Detección mediante Western blot del nivel de p-Ser-GSK-3 en homogenados de estriado, corteza e hipocampo de ratones WT y R6/1 a los 7.5 meses de edad (n=7 para estriado, n=7 para corteza y n=7 para hipocampo; test t-Student; ** $p<0.01$, * $p<0.05$).

Para confirmar que la disminución del nivel total de GSK-3 y el incremento de p-GSK-3 observado, resulta en una disminución de la actividad del enzima, hicimos el ensayo de actividad enzimática quinasa GSK-3 en homogenados procedentes de estriado, corteza e hipocampo de ratones R6/1 de 7.5 meses de edad. Como esperábamos, observamos que la actividad de GSK-3 estaba disminuida significativamente en el estriado (21.6%; $p=0.006$) de ratones R6/1 sintomáticos comparada con la actividad del enzima en ratones WT, mientras que, sólo vemos tendencia a disminuir en la corteza y en el hipocampo de los ratones R6/1 (Figura 15).

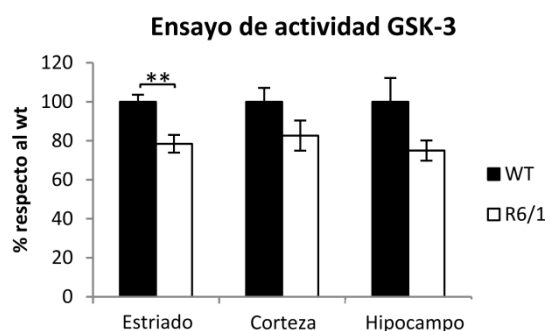


Figura 15: Disminución de la actividad de GSK-3 α/β en el estriado, la corteza y el hipocampo de los ratones R6/1. Ensayo de actividad quinasa *in vitro* de GSK-3 en homogenados de estriado, corteza e hipocampo de ratones WT y R6/1 a los 7.5 meses de edad ($n=5-6$ para estriado, $n=6-5$ para corteza y $n=5$ para hipocampo, test *t*-Student; * $p<0.05$, ** $p<0.01$).

Todo esto evidencia que, al igual que en los pacientes de la EH, el ratón modelo de la enfermedad R6/1, también muestra una disminución de la actividad GSK-3 en las zonas cerebrales más afectadas por la EH.

2. Generación de ratón de la Enfermedad de Huntington con expresión transgénica de GSK-3 para corregir la disminución de GSK-3 endógena

Para testar si la disminución de actividad GSK-3 que observamos en el cerebro de los pacientes y en el ratón modelo de la EH contribuye a la sintomatología de la enfermedad, decidimos explorar las consecuencias de modificar los niveles de GSK-3 mediante manipulación genética para corregir el defecto que observamos. Para ello, produjimos ratones R6/1 con niveles variables de expresión de GSK-3 transgénica. En el laboratorio, previamente se generó la línea transgénica de ratón BitetO- β -Gal/GSK-3 β (Lucas et al., 2001) la cual contiene una construcción de ADN con la secuencia de GSK-3 β y, como reportero de la expresión génica, la secuencia del gen de la β -Galactosidasa (LacZ) con una señal de

localización nuclear. Estas dos secuencias codificantes, están bajo el control de dos promotores mínimos (CMVmin) en el promotor bidireccional tetO (BitetO) (Figura 16A). Este ratón, muestra una expresión moderada del reportero β -Galactosidasa en áreas cerebrales como el estriado, la corteza o el hipocampo (Figura 16B) y, sólo las células con niveles elevados de β -Galactosidasa muestran un incremento de los niveles de GSK-3 como se evidencia con la doble inmunofluorescencia β -Gal/GSK-3 (Figura 16C). En previas caracterizaciones de este ratón, no se han observado fenotipos comportamentales obvios (Hernandez et al., 2002, Engel et al., 2006b). Aquí, nos referiremos a estos animales como ratones LowTgGSK-3. También se ha reportado previamente en el laboratorio que, cuando los ratones LowTgGSK-3 se combinan con ratones que expresan el transactivador tetraciclina (tTA) bajo el control del promotor neuronal de cerebro anterior CamKII α (ratón CamKII α -tTA), el ratón doble transgénico resultante CamKII α -tTA+BitetO- β -Gal/GSK-3 β (Figura 16D), muestra una expresión robusta neuronal en todas las regiones del cerebro anterior como el estriado, la corteza y el hipocampo (Figura 16E). Nos referiremos a partir de ahora a estos ratones como ratones HighTgGSK-3. Estos ratones, muestran un incremento de la muerte neuronal, particularmente en el hipocampo, y presentan alteraciones bioquímicas y comportamentales similares a las observadas en la Enfermedad de Alzheimer (Lucas et al., 2001, Hernandez et al., 2002, Engel et al., 2006b).

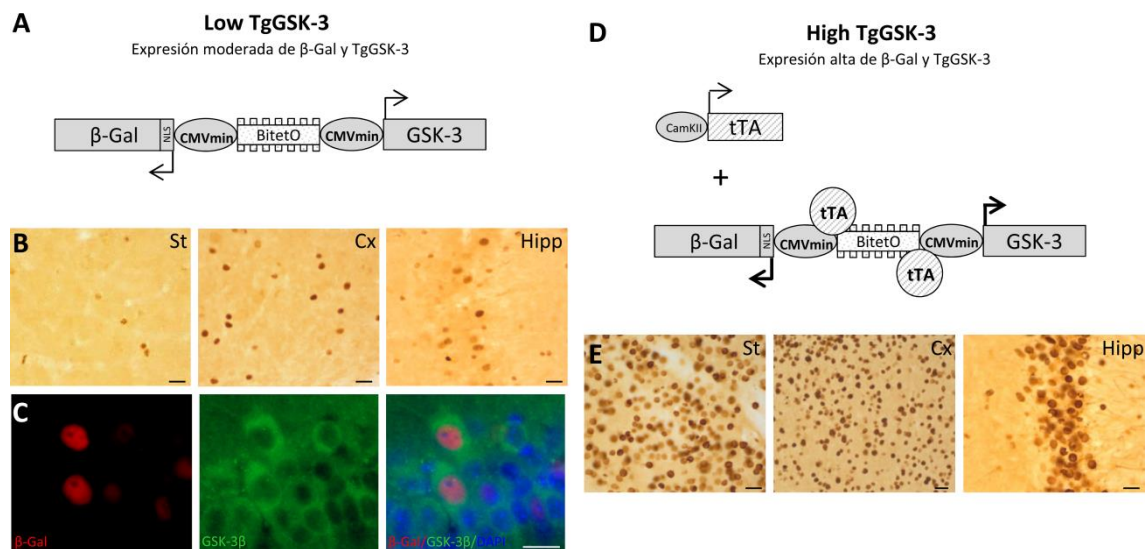


Figura 16: Generación de ratones R6/1 con niveles variables de expresión de GSK-3 transgénica. (A) Diagrama que muestra la estructura de la construcción de GSK-3 usada para la transgénesis del LowTgGSK-3. (B) Inmunohistoquímica β -gal en secciones sagitales de cerebro de ratones LowTgGSK-3 de 8 meses de edad en el estriado, corteza e hipocampo. (C) Doble inmunofluorescencia de β -Gal (rojo) y GSK-3 β (verde) en secciones de hipocampo en ratones LowTgGSK-3. (D) Representación esquemática de la generación de ratones HighTgGSK-3. (E) Inmunohistoquímica de β -Gal en secciones sagitales de cerebro de ratones HighTgGSK-3 de 8 meses de edad en estriado, corteza e hipocampo. Las barras de escala corresponden a 20 μ m.

En resumen, mediante el uso de este sistema transgénico condicional podemos generar ratones con nivel moderado (LowTgGSK-3) o robusto (HighTgGSK-3) de expresión transgénica de GSK-3. Esto también se observa mediante el análisis por RT-PCR cuantitativa relativa del nivel de ARNm de GSK-3 transgénico y de GSK-3 total en estos ratones. (Figura 17).

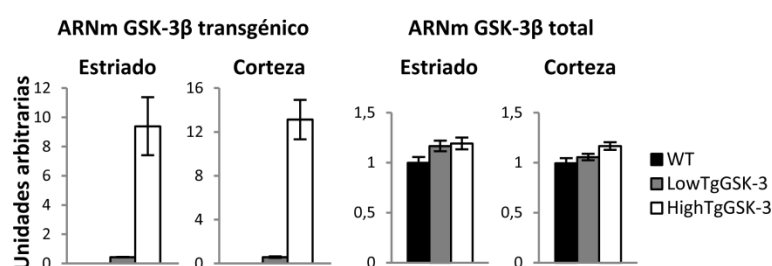


Figura 17: Nivel de ARNm de GSK-3β transgénico y total en ratones LowTgGSK-3 y HighTgGSK-3. Análisis mediante RT-PCR cuantitativa relativa de los niveles de ARNm de GSK-3β transgénico y GSK-3β total (endógeno+transgénico) en el estriado y la corteza de ratones WT, LowTgGSK-3 y HighTgGSK-3.

Para generar ratones R6/1 con diferentes niveles de sobreexpresión transgénica de GSK-3, seguimos el protocolo de cruces mostrado en la figura 18 para llegar al cruce HighTgGSK-3 x R6/1 que da lugar a los seis genotipos experimentales relevantes para el estudio: ratones *wild type* (WT), LowTgGSK-3, HighTgGSK-3, R6/1, R6/1+LowTgGSK-3 y R6/1+HighTgGSK-3.

Generación de ratones R6/1+LowTgGSK-3 y R6/1+HighTgGSK-3

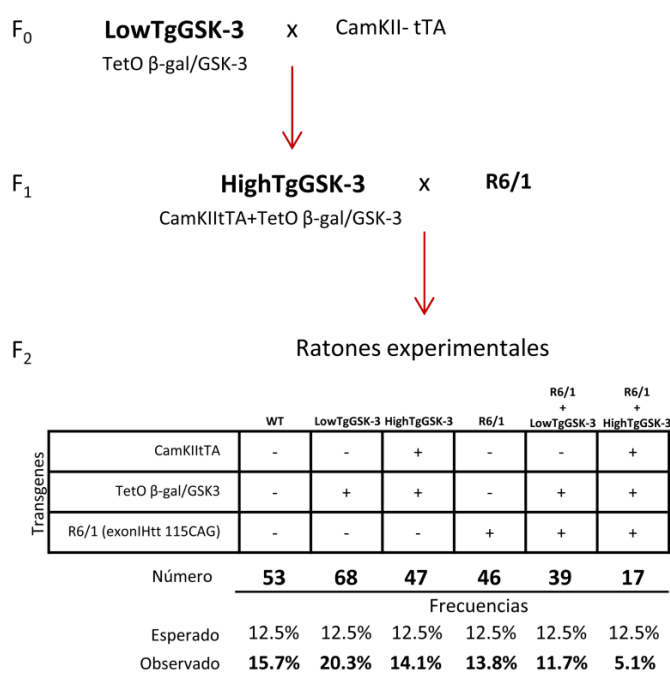


Figura 18: Generación de ratones R6/1 con niveles variables de expresión transgénica de GSK-3. Representación esquemática del protocolo de cruces para obtener ratones R6/1 con LowTgGSK-3 o HighTgGSK-3. Número de ratones de cada uno de los seis genotipos experimentales obtenidos para todo el estudio así como las frecuencias observadas y esperadas.

Generamos un total de 270 ratones, distribuidos en los genotipos experimentales del siguiente modo: WT (n=53), LowTgGSK-3 (n=68), HighTgGSK-3 (n=47), R6/1 (n=46), R6/1+LowTgGSK-3 (n=39) y R6/1+HighTgGSK-3 (n=17). Los animales no se distribuyeron de forma mendeliana entre los diferentes genotipos (análisis Chi-cuadrado χ^2 $p < 0.0001$) ya que el porcentaje de ratones R6/1+HighTgGSK-3 (5.1%) fue menor que el esperado (12.5%), indicándonos que existe letalidad embrionaria o perinatal debido a la combinación de la toxicidad asociada a la Htt mutada y al exceso de la expresión de GSK-3 en los ratones R6/1+HighTgGSK-3.

A continuación, verificamos mediante *Western Blot*, que la disminución del nivel de la proteína GSK-3 previamente observada en el estriado de los ratones R6/1, se corrige progresivamente mediante la expresión moderada y robusta del transgén de GSK-3 (Figura 19A). Observamos el mismo efecto mediante el ensayo enzimático de actividad quinasa GSK-3 (Figura 19B), aunque el número limitado de ratones no nos permitió reproducir la disminución significativa de R6/1 respecto a WT previamente descrita en la Figura 15.

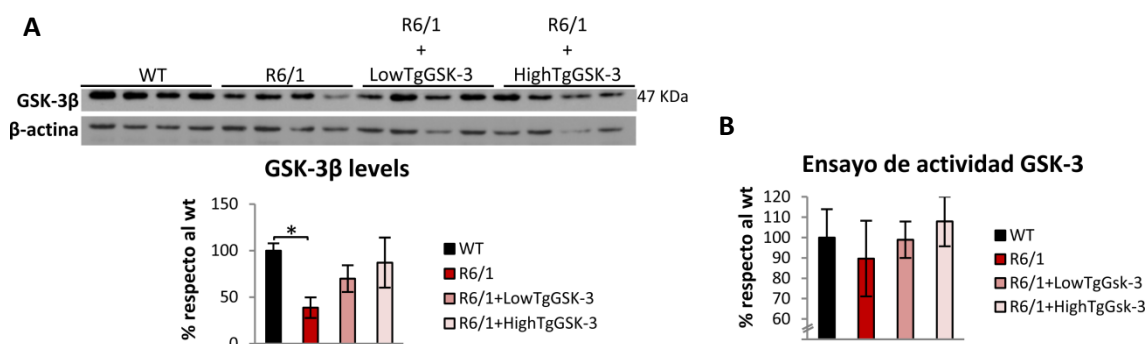


Figura 19: Análisis del nivel y actividad de GSK-3 en ratones WT, R6/1, R6/1+LowTgGSK-3 y R6/1+HighTgGSK-3. (A) Detección mediante Western blot de GSK-3β en homogenados de estriado de ratones WT, R6/1, R6/1+LowTgGSK-3 y R6/1+HighTgGSK-3 (n=4; ANOVA, seguido por el test post hoc Games-Howell; * $p < 0.05$). (B) Ensayo de actividad *In vitro* GSK-3 llevado a cabo en homogenados de estriado de ratones WT (n=4), R6/1 (n=4), R6/1+LowTgGSK-3 (n=4) y R6/1+HighTgGSK-3 (n=4) a 3.5 meses de edad.

3. Análisis del efecto de modificar genéticamente GSK-3 en ratones modelo de la Enfermedad de Huntington

3.1. La sobreexpresión moderada de GSK-3 atenúa la atrofia cerebral en los ratones R6/1

Como indicador global de si la expresión moderada o alta de GSK-3 transgénica tuviera un efecto positivo en la progresión del fenotipo EH de los ratones R6/1, analizamos el volumen del estriado, la corteza y el hipocampo, a partir de secciones sagitales obtenidas de ratones de 8 meses de edad, WT, R6/1, R6/1+LowTgGSK-3 y R6/1+HighTgGSK-3. Anteriormente ha sido reportado que los ratones R6/1 presentaban una reducción en el volumen de estas regiones cerebrales comparado con los ratones WT (Mangiarini et al., 1996). Curiosamente, los ratones R6/1+LowTgGSK-3 mostraron una atenuación de la atrofia del volumen de la corteza ($p=0.0163$) y del hipocampo ($p=0.0252$) ya que el volumen fue mayor que en los R6/1 y, también se observa una tendencia a este incremento del volumen en el estriado (Figura 20). Por el contrario, no observamos diferencias entre el R6/1 y el R6/1+HighTgGSK-3, indicándonos que, una sobreexpresión moderada de GSK-3 para corregir la disminución del volumen inherente en los R6/1, es beneficioso, pero una producción excesiva de GSK-3 no es buena, debido a la bien documentada toxicidad neuronal del exceso de actividad GSK-3 (Lucas et al., 2001, Beurel and Joep, 2006).

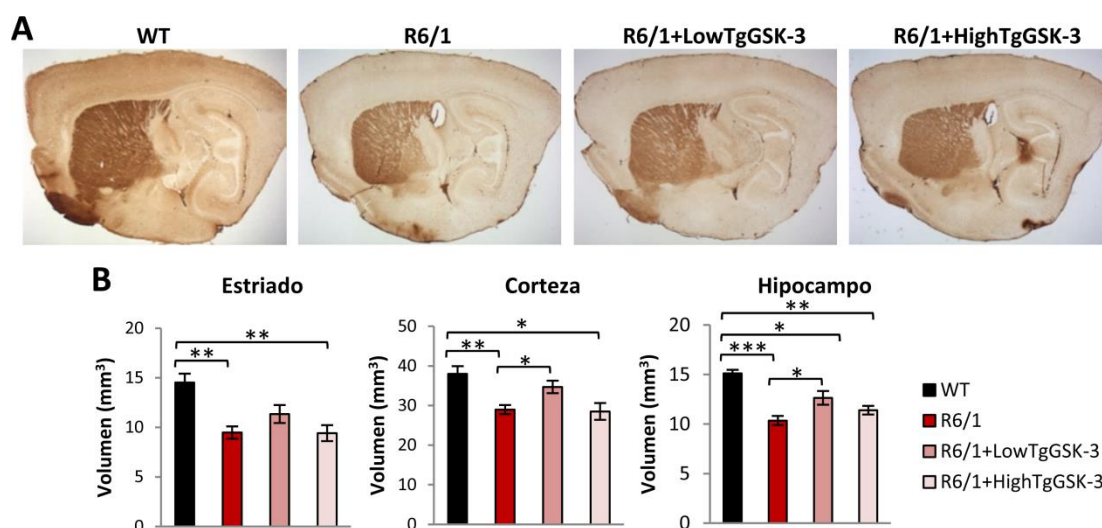


Figura 20. Análisis volumétrico de cerebro anterior en ratones R6/1 con niveles variables de expresión de GSK-3 transgénica. (A) Imágenes representativas de secciones sagitales teñidas con DARPP-32 de ratones WT, R6/1, R6/1+LowTgGSK-3 y R6/1+HighTgGSK-3 de 8 meses de edad. (B) Los histogramas muestran la cuantificación del volumen estriatal, cortical e hipocámpal. Los resultados están expresados como media \pm SEM. Al menos 4 animales por genotipo han sido analizados.

También analizamos el efecto de los diferentes niveles de expresión de GSK-3 transgénica en la acumulación de las inclusiones Htt positivas en los R6/1. El número y el tamaño fue analizado en el estriado de ratones de 8 meses de edad R6/1, R6/1+LowTgGSK-3 and R6/1+HighTgGSK-3 mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo N-terminal-Htt. No encontramos cambios en el número de las inclusiones estriatales en los ratones R6/1+LowTgGSK-3 y R6/1+HighTgGSK-3 cuando los comparamos con los ratones R6/1. Sin embargo, vimos que se producía una tendencia a aumentar el tamaño de las inclusiones proporcional al aumento de la expresión transgénica de GSK-3 llegando a ser significativa en los ratones R6/1+HighTgGSK-3 comparado con los ratones R6/1, $p=0.035$) (Figura 21).

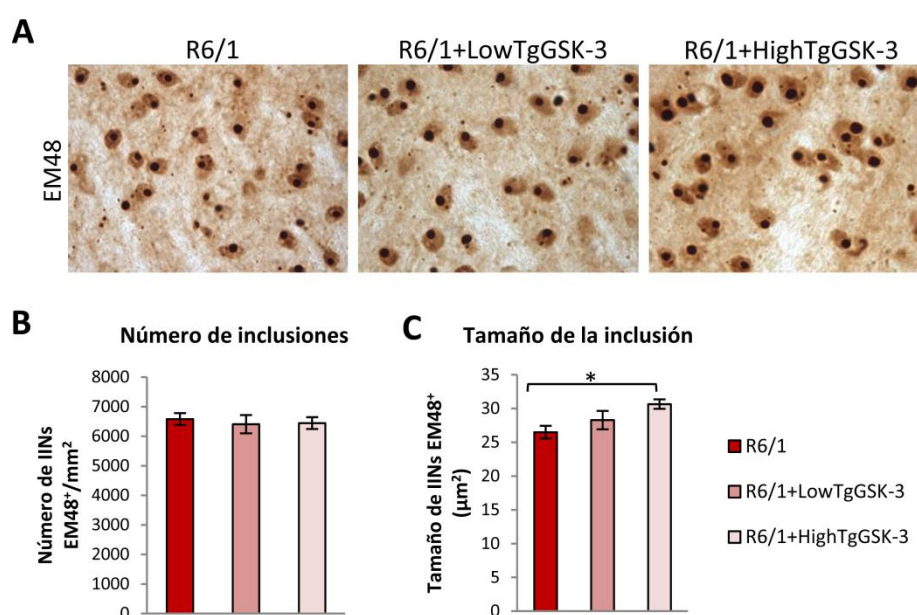


Figura 21. Análisis volumétrico de cerebro anterior en ratones R6/1 con niveles variables de expresión transgénica de GSK-3. (A-B-C) Inmunohistoquímica con EM48 para detectar las inclusiones de Htt mutada estriatales. **(A)** Imágenes mostrando inclusiones EM48-positivas en ratones R6/1, R6/1+LowTgGSK-3 y R6/1+HighTgGSK-3. **(B-C)** Histogramas mostrando el número **(B)** y tamaño **(C)** de las inclusiones intranucleares neuronales (IINs) en ratones R6/1, R6/1+LowTgGSK-3 y R6/1+HighTgGSK-3. (ANOVA, seguido por el test de comparación múltiple DMS; * $p<0.05$).

3.2. La expresión moderada de GSK-3 transgénica atenúa los déficits motores y cognitivos de los ratones R6/1.

A continuación evaluamos si la expresión transgénica de GSK-3, particularmente la moderada, era capaz de corregir el déficit en el fenotipo motor y cognitivo que presentan los ratones R6/1. Para ello, primero analizamos los seis grupos experimentales de ratones en el test campo abierto, en el cual se analiza el comportamiento de los ratones en un unas cajas automatizadas obteniendo diferentes parámetros sobre su actividad. Observamos que la

hipoactividad descrita en los ratones R6/1 respecto a los WT a los 4.5 meses de edad, evidenciada por la disminución en la distancia ambulatoria y las cuentas verticales o veces que el animal se pone en posición vertical, se atenuaba en ratones R6/1+LowTgGSK-3 y R6/1+HighTgGSK-3 durante el tiempo de exploración (0-5 min) pero, curiosamente, sólo los ratones R6/1+lowTgGSK-3 mostraron una mejora durante el tiempo del test 5-15 min (Figura 22).

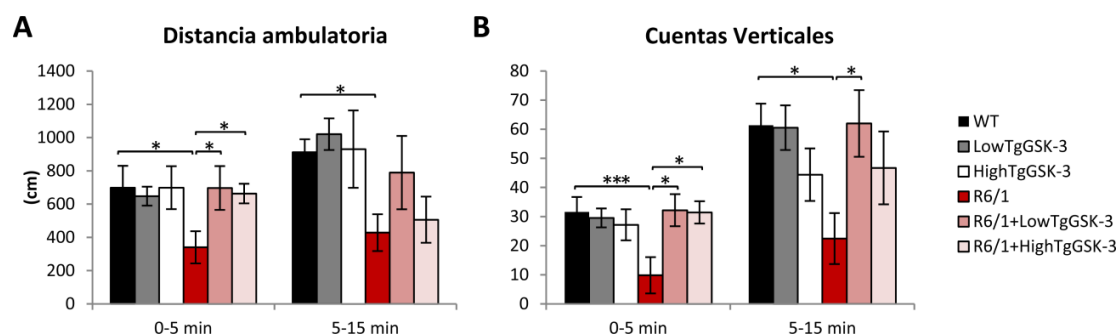


Figura 22: La expresión transgénica moderada en los ratones LowTgGSK-3 mejora las tareas motoras respecto a los ratones R6/1. (A-B) Test de campo abierto de ratones WT (n=19); LowTgGSK-3 (n=22); HighTgGSK-3 (n=13); R6/1 (n=19); R6/1+LowTgGSK-3 (n=17) y R6/1+HighTgGSK-3 (n=7) a los 4.5 meses de edad. (Kruskall Wallis, seguido de test U Mann Whitney; * $p<0.05$, * $P<0.001$).**

Seguidamente, analizamos la coordinación motora de los ratones a los 2, 4, 6 y 8 meses de edad en el test de rotarod con aceleración (de 4 a 40 rpm) durante un periodo de 5 minutos en 4 pruebas. Como esperábamos, todos los ratones que expresan la Htt mutada, mostraron un déficit en coordinación motora a los 4 meses de edad que empeora conforme progresa la enfermedad a estadios sintomáticos tardíos a los 8 meses de edad. Cuando analizamos el tiempo que tardan en caer desde el rodillo en porcentaje respecto a los animales R6/1, los ratones R6/1+LowTgGSK-3 lo hicieron significativamente mejor que los R6/1 y R6/1+HighTgGSK-3 a los 2, 4 y 6 meses de edad (Figura 23).

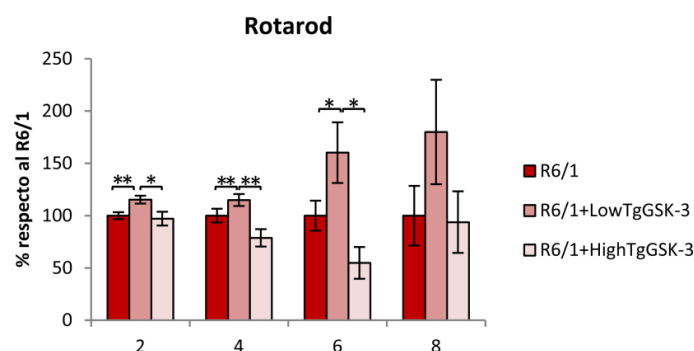


Figura 23: La expresión transgénica moderada en los ratones LowTgGSK-3 mejora las tareas motoras respecto los ratones R6/1. Rotarod. Evolución de la media de la latencia en caer desde el rodillo de ratones de 2 a 8 meses de edad. Ratones WT (n=25); LowTgGSK-3 (n=52); HighTgGSK-3 (n=28); R6/1 (n=30); R6/1+LowTgGSK-3 (n=27) y R6/1+HighTgGSK-3 (n=12). El histograma muestra el porcentaje respecto a los R6/1 de la latencia a caer de los ratones R6/1+LowTgGSK-3 y R6/1+HighTgGSK-3. (Kruskall Wallis, seguido del test U Mann Whitney; ** $P<0.01$, * $p<0.05$).

Finalmente, evaluamos la función cognitiva de los seis grupos experimentales en el test de condicionamiento aversivo. Más concretamente, realizamos el test dependiente de contexto que evalúa la memoria dependiente del hipocampo del animal. La figura 24A muestra las gráficas representativas del tiempo que el ratón pasa en estado de *freezing* (verde) que es cuando el animal se queda inmóvil porque recuerda el estímulo condicionante, respecto al tiempo que pasa en actividad (amarillo) para cada uno de los genotipos. Como podemos ver, los ratones R6/1 mostraron un claro déficit cognitivo, ya que el porcentaje de tiempo que los ratones R6/1 pasan haciendo *freezing* está dramáticamente reducido comparado con los WT. Sin embargo, este déficit se atenúa en los ratones R6/1+LowTgGSK-3 que pasan más tiempo haciendo *freezing* que los R6/1 (Figura 24B).

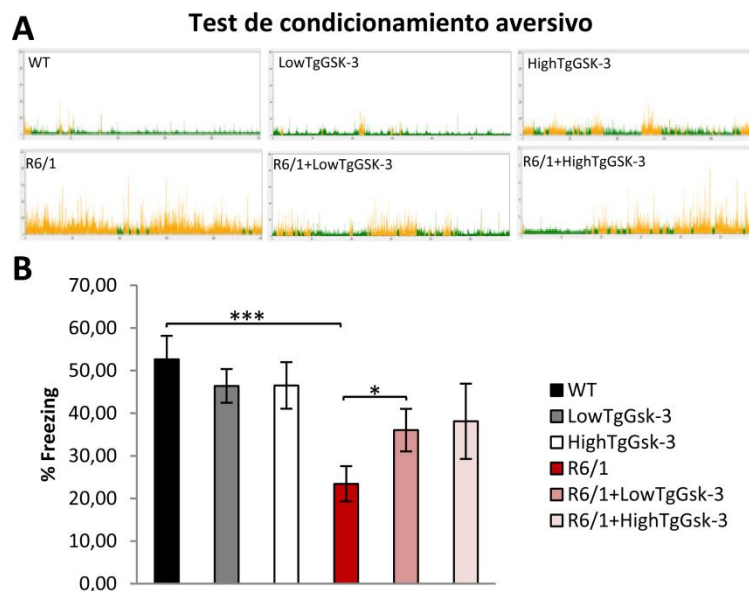


Figura 24: La expresión LowTgGSK-3 mejora las tareas cognitivas en los ratones R6/1. (A) Representación del tiempo que el ratón pasa haciendo *freezing* (verde) o no (amarillo) en el test de condicionamiento aversivo. **(B)** El histograma muestra el porcentaje de *freezing* en el test de ratones WT ($n=32$); LowTgGSK-3 ($n=32$); HighTgGSK-3 ($n=22$); R6/1 ($n=27$); R6/1+LowTgGSK-3 ($n=26$) y R6/1+HighTgGSK-3 ($n=10$) a los 5 meses de edad (Kruskal Wallis, seguido de test U Mann-Whitney; *** $P<0.001$, * $p<0.05$).

En conjunto, estos resultados demuestran que un incremento moderado de la expresión de GSK-3 es capaz de atenuar los déficits motores y cognitivos descritos en los ratones R6/1.

4. Análisis del estado de fosforilación del sustrato de GSK-3, Tau, en cerebro del ratón modelo de la Enfermedad de Huntington

Tras la detección de una disminución de la actividad GSK-3 en la EH, nos preguntamos si esto, se traduciría en una disminución del nivel de fosforilación de uno de sus más relevantes sustratos por su implicación en numerosas enfermedades neurodegenerativas, la proteína asociada a microtúbulos Tau. Para ello, realizamos *Western Blot* en muestras de estriado, corteza e hipocampo procedente de ratones R6/1 sintomáticos para detectar el nivel de fosforilación de Tau con el anticuerpo PHF-1 (Figura 25).

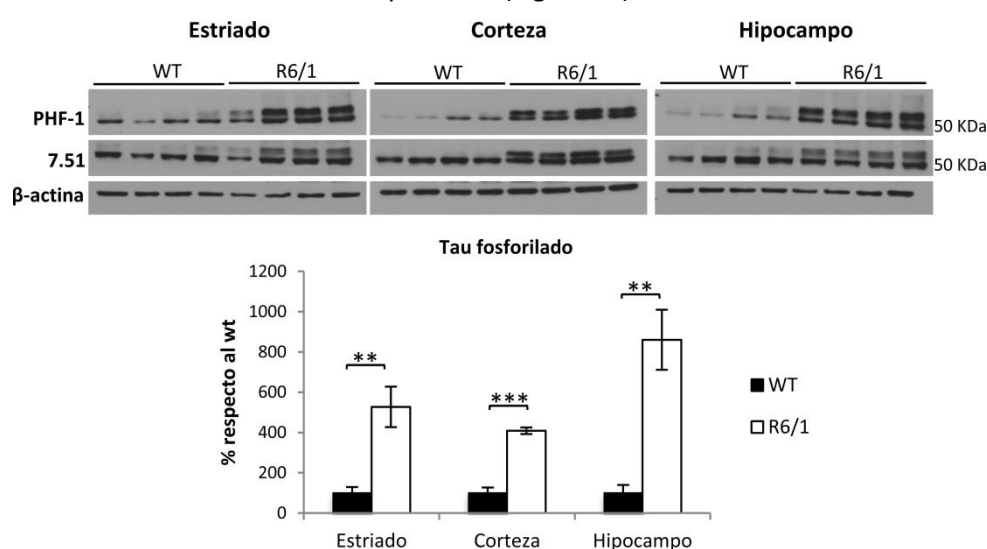


Figura 25: Incremento de Tau fosforilado en el cerebro de los ratones R6/1. Detección mediante *Western blot* del nivel de p-Tau en homogenados de estriado, corteza e hipocampo de ratones WT y R6/1 a los 7.5 meses de edad ($n=7$ para estriado, $n=7$ para corteza y $n=7$ para hipocampo; test *t*-Student; *** $p<0.001$, ** $p<0.01$).

Contra todo pronóstico, encontramos que se producía un incremento significativo en la fosforilación de Tau tanto en el estriado ($p=0.0065$), la corteza ($p=0.0006$) y el hipocampo ($p=0.0026$) de los ratones R6/1. Este resultado era contrario a lo que esperábamos tras la demostración previa de que en la EH, se produce una disminución de la actividad GSK-3 y, por tanto, de su capacidad de fosforilar Tau. Son muchas las posibles explicaciones para estos resultados contradictorios entre los que se encuentran un aumento en la EH de la actividad de otras quinasas que también fosforilan Tau tales como CDK-5 (Paoletti et al., 2008) o la disminución de la actividad de fosfatasa como la calcineurina (Xifro et al., 2009, Gratuze et al., 2014) y, por último también pensamos que el aumento aparente de la fosforilación se podía deber al aumento de la cantidad total de Tau, como vemos en la Figura 25 con el anticuerpo

7.51 que reconoce Tau total o a un cambio en el patrón de las isoformas de *splicing* como se analiza más adelante.

5. Análisis del sustrato de GSK-3, Tau, en cerebro de pacientes y ratón modelo de la Enfermedad de Huntington

5.1. Incremento del nivel de Tau total y alteración del ratio de sus isoformas en pacientes de Enfermedad de Huntington

Ante el incremento de Tau total que observamos en los ratones R6/1, nos propusimos analizar qué ocurre en los pacientes de EH. Como hemos mencionado en la introducción, en el cerebro adulto, existen seis isoformas de Tau, la mitad con tres dominios de unión a microtúbulos o repeticiones (isoformas Tau-3R) y la otra mitad con cuatro dominios de unión a microtúbulos o repeticiones (isoformas Tau-4R). Puesto que está descrito que en FTDP-17, mutaciones en el gen de Tau producen un desbalance en las isoformas de Tau a favor de las 4R y, que esto es responsable de la neurodegeneración observada en esta enfermedad, nos propusimos analizar si la neurodegeneración observada en la EH es consecuencia de un incremento a favor de las isoformas Tau-4R. Para ello realizamos RT-PCR cuantitativa absoluta de ARN extraído del estriado y la corteza de pacientes de la EH y de sujetos control. En primer lugar, observamos que el número de copias por ng de ARNm de Tau total es equivalente entre sujetos control y pacientes tanto en el estriado como en la corteza (Figura 26).

A continuación, observamos que, mientras que en el estriado de sujetos control, el nivel de ARNm de las isoformas Tau-3R predomina sobre la cantidad de ARNm de las isoformas Tau-4R (59.1% vs. 40.9%), en las muestras procedentes de pacientes de EH, la proporción se desplaza hacia un mayor contenido de las isoformas de ARNm Tau-4R (46.3% vs. 53.7%) (Figura 26). Como consecuencia, el ratio 4R/3R entre las isoformas de Tau aumenta dramáticamente en las muestras de pacientes de EH respecto a los controles (1.77 veces, $p=0.002$) (Figura 26). En la corteza, el ARNm de las isoformas Tau-3R predomina sobre el ARNm de las isoformas Tau-4R tanto en controles como en pacientes. Sin embargo, como las diferencias son mayores en los controles (62.8% vs. 37.2%) que en los pacientes de EH (56.3% vs. 43.7%) (Figura 26), el ratio 4R/3R es significativamente mayor en la corteza de los pacientes de EH (1.43 veces, $p=0.015$) (Figura 26).

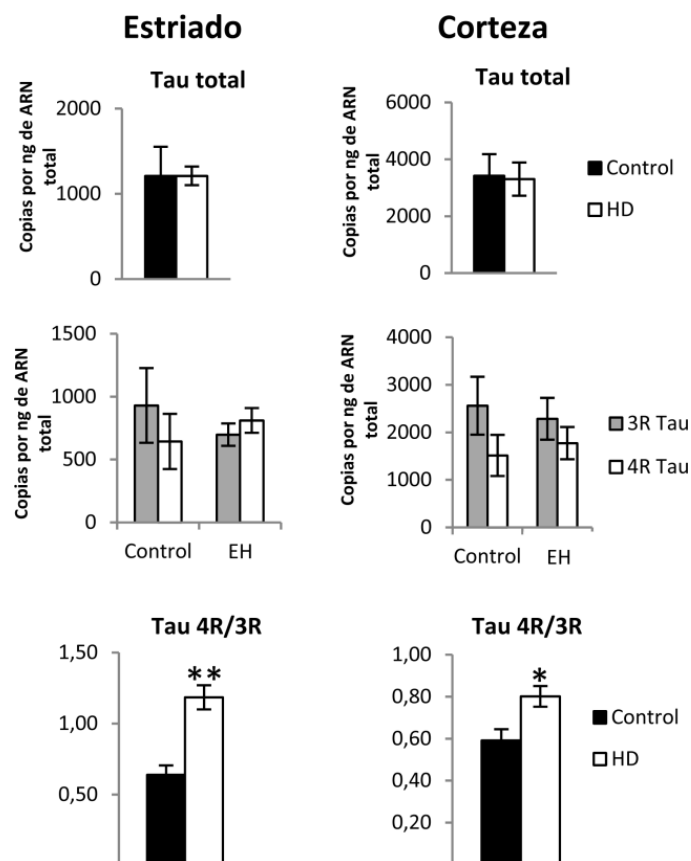


Figura 26: Incremento del ratio 4R/3R de Tau a nivel de ARNm en cerebros de EH Análisis por RT-PCR cuantitativa absoluta del ARNm de Tau total y de las isoformas del ARNm de Tau 3R y Tau 4R en el estriado y la corteza de pacientes de EH y controles, realizamos una curva estándar con un plásmido que contiene una copia de cada fragmento que fue amplificado con cada par de cebadores específicos (para Tau total, y para las isoformas 3R y 4R) y fue ensayado en paralelo para la estimación del número de copias por ng de ARN total en cada muestra (n=5-9 para estriado y n=9-10 para corteza; test t Student; ** p<0.01, * p<0.05; sólo las muestras con numero de integridad de ARN (RIN) por encima de 5 fueron incluidas en el análisis).

Para descartar cualquier posible influencia de la variación del tiempo *post-mortem* de unas muestras respecto a otras en la degradación de forma diferencial de unos ARNm respecto a otros y, descartar que el desbalance que observamos en las isoformas de Tau fuera debido a que el ARNm de unas isoformas se degrade más que otras, dejamos ARN de un control y de un paciente de EH durante 24 o 48 horas a 4°C para que se produjera una disminución en la integridad del ARN (RIN) simulando diferentes tiempos *post-mortem* y, confirmamos que el ratio de las isoformas de Tau 4R/3R permanecía constante a lo largo del tiempo (Figura 27).

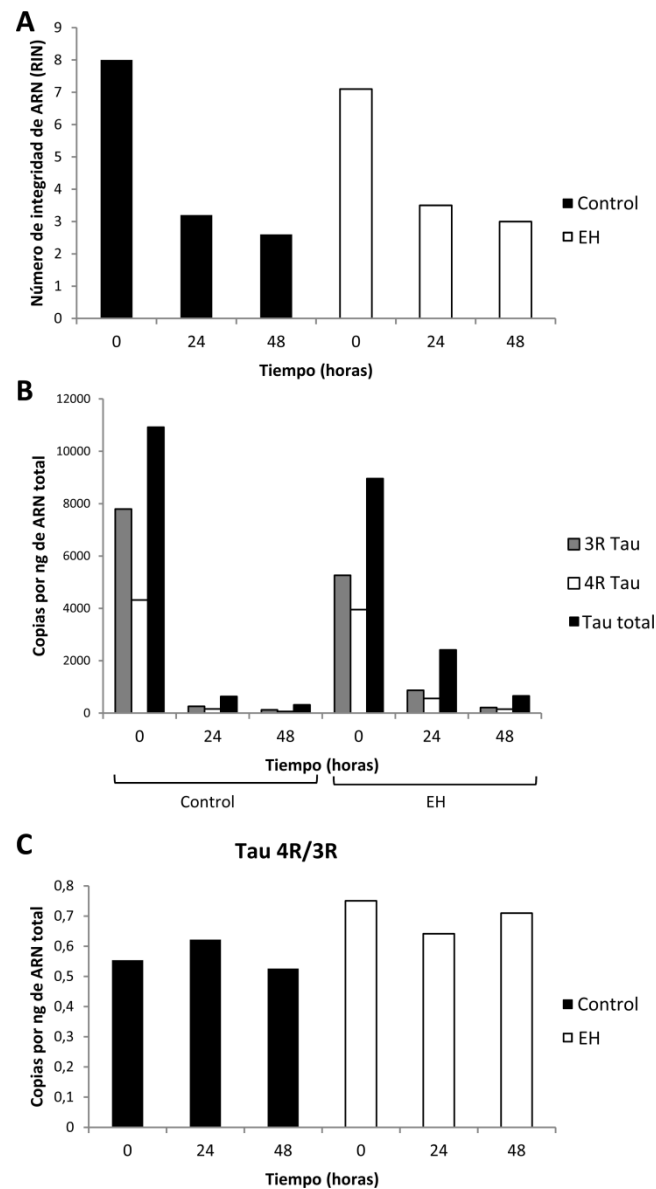


Figura 27: El intervalo post-mortem simulado (IPM) no afecta diferencialmente a los niveles de ARNm de Tau-3R, Tau-4R y de Tau total. (A) Número de integridad de ARN (RIN) de ARN extraído de corteza de muestras de controles y de pacientes de EH que han sido dejados a 4°C durante 24 y 48 horas antes de la homogenización y la extracción de ARN. Los valores de RIN eran comparables entre las muestras control y de EH a todos los tiempos. **(B)** Análisis por RT-PCR cuantitativa de las isoformas de ARNm de Tau-3R y Tau-4R y del ARNm de Tau total. **(C)** El ratio 4R/3R de una muestra (control y HD) no está significativamente alterada por la disminución del RIN a lo largo del tiempo.

Seguidamente, utilizamos los anticuerpos específicos de las isoformas Tau-3R y Tau-4R (RD3 y RD4 respectivamente) para explorar mediante *Western blot*, si se producía un incremento del ratio 4R/3R a nivel de proteína equivalente al observado a nivel de ARNm. Observamos que las muestras procedentes de pacientes de EH, muestran un claro incremento a nivel de proteína de las isoformas Tau-4R en el estriado y en la corteza y, una clara

disminución de las isoformas Tau-3R particularmente en el estriado (Figura 28). En concordancia con los datos de ARNm, el incremento del ratio 4R/3R es mayor en el estriado que en la corteza (3.08 veces, $p=0.006$ y 2.1 veces, $p=0.013$; respectivamente) (Figura 28). Curiosamente, mientras el contenido de Tau total era similar en el estriado de controles y pacientes de la EH, en la corteza se producía un claro incremento en los sujetos con la EH (1.52 veces, $p=0.016$) con la aparición de bandas de bajo peso molecular (35 and 39 KDa) correspondientes a formas truncadas de Tau (Figura 28).

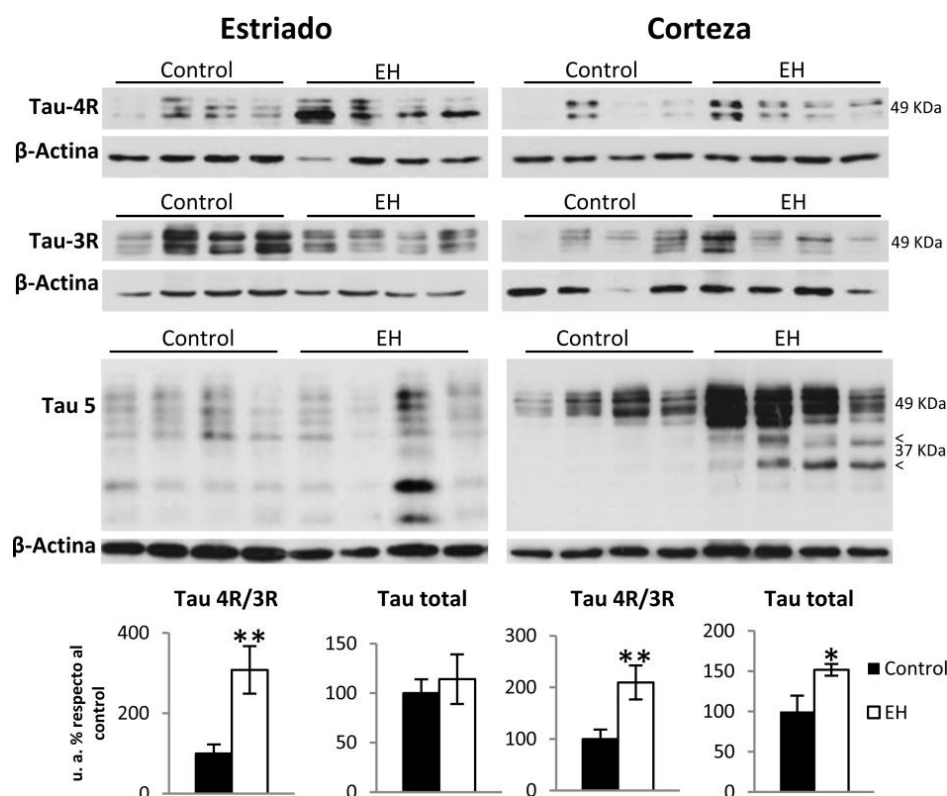


Figura 28: Incremento del ratio 4R/3R de Tau a nivel de proteína e incremento de la proteína Tau total. Análisis por Western blot de las isoformas de Tau 3R y 4R con los anticuerpos específicos RD3 y RD4 y Tau total con el anticuerpo Tau 5 en homogenados totales de estriado y corteza en cerebros control y de pacientes de la EH ($n=13-16$ para estriado y $n=11$ para corteza; test U Mann-Whitney, * $p<0.05$).

Este incremento del nivel de Tau total con la aparición de las bandas de 35 y 39 KDa, también se observaron con el anticuerpo 5E2 que también detecta Tau total, confirmandonos la especificidad de las bandas de bajo peso molecular (Figura 29).

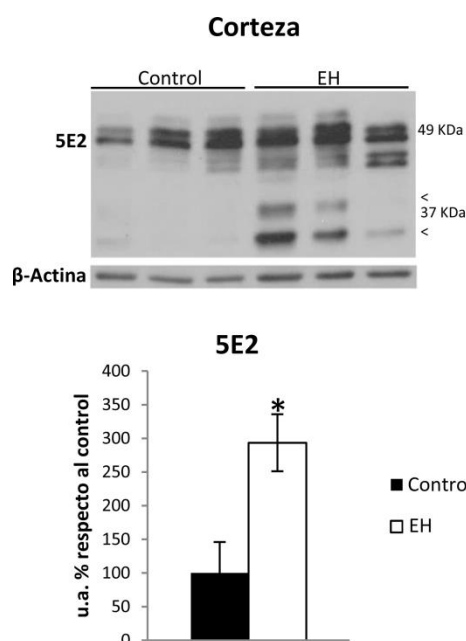


Figura 29: Incremento de Tau total y aparición de Tau truncado en la corteza de los pacientes de EH evidenciado con el anticuerpo 5E2. Análisis por Western blot de Tau total con el anticuerpo 5E2 de cerebros de controles y pacientes de EH ($n=5-6$; test t-Student; * $p<0.05$). Las flechas indican bandas adicionales a 35 y 39 KDa.

5.2. Descripción de una nueva marca histopatológica de Tau en pacientes de la Enfermedad de Huntington

Tras la alteración de Tau observada bioquímicamente en la EH, nos preguntamos si había alguna marca histopatológica asociada a esta alteración. Para ello, realizamos diferentes inmunohistoquímicas con el anticuerpo específico RD4 para detectar Tau-4R y, con anticuerpos que reconocen Tau total (Tau5 y HT-7) en secciones de corteza y estriado de pacientes de EH y sujetos control. Sorprendentemente, con los tres anticuerpos que reconocían Tau, fuimos capaces de detectar unos depósitos en forma de varilla que atraviesan de forma parcial o total el núcleo de la neurona y que no habían sido descritos anteriormente (Figura 30).

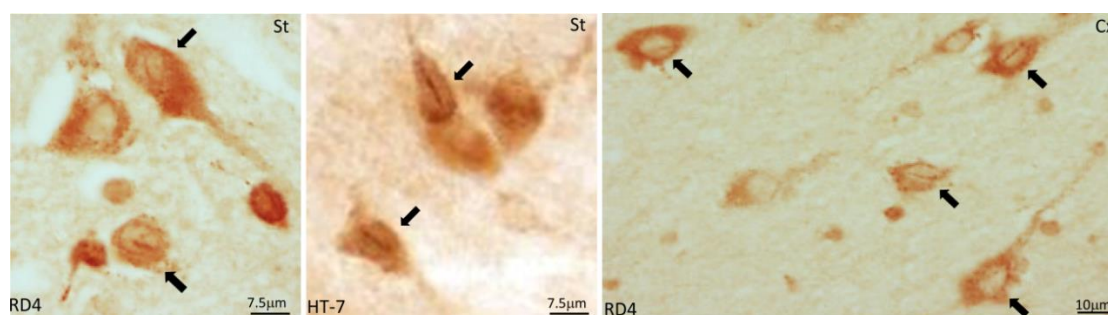


Figura 30: Descubrimiento de los Tau-nuclear rods (TNRs) en cerebros de pacientes de la EH. Inmunohistoquímica con los anticuerpos RD4 y HT-7 en estriado (St) y corteza (Cx) en cerebro de pacientes de la EH. Las flechas indican neuronas con TNRs. La barra de escala corresponde a 7.5 μm para St v 10 μm para Cx.

A esta nueva marca histopatológica de Tau la hemos denominado *Tau nuclear rods* (TNRs). Éstos se detectan tanto en el estriado como en la corteza de cada caso de EH analizado (n=24) y, su abundancia oscila de unos casos a otros de moderada a muy elevada en función del anticuerpo utilizado. Por el contrario, en el estriado de los casos control (n=23), los TNRs están prácticamente ausentes ya que sólo se detectaron en tres o menos casos dependiendo del anticuerpo utilizado y, siempre son escasos. Similar, pero un poco más abundante fue la incidencia de TNRs en la corteza de los casos control (Tabla 6).

Tabla 6: Cuantificación relativa de TNRs. Detectados con varios anticuerpos anti-Tau: (-) ausencia, (+) moderada, (++) elevada, (+++) muy alta. IPM: intervalo post-mortem (horas). H: Hombre. M: Mujer. n/d: no disponible.

	Código	Grado Vonsattel	N. Repeticiones	Sexo	Edad	IPM	Estriado				Corteza			
							HT7	RD4	Tau 5	RD3	HT7	RD4	Tau 5	RD3
Casos EH	BCPA 138	n/d	n/d	H	43	n/d	++	-	+	-	++	-	++	-
	nhb 03-047	2-3	n/d	M	50	5:40	+++	++	++	++	++	++	+++	++
	CS1294	3	45 +/- 2	H	53	7:00	+	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
	BCPA 112	n/d	n/d	M	53	n/d	+	-	+	+	+	-	-	-
	CS1193	3-4	n/d	H	55	7:00	+	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
	CS1120	3	48	H	55	15:00	+	n/d	n/d	n/d	++	n/d	n/d	n/d
	CS0371	3	n/d	H	55	23:00	+	-	++	+	-	-	-	+
	BCPA 324	n/d	n/d	H	55	n/d	+	+	+	+	+	+	+	+
	CS0801	3	44	H	59	5:30	+	++	++	++	++	++	++	++
	CS0909	3	43	H	60	13:05	+	-	++	+	++	+	++	+
	nhb 01-128	2	n/d	H	61	10:25	+	+	++	+	+	++	++	+
	BCPA 79	n/d	n/d	H	61	n/d	++	+	+	+	+++	++	++	+
	BCPA 336	n/d	n/d	M	62	n/d	-	n/d	+	-	+	n/d	+	+
	nhb 09-063	4	n/d	M	64	5:00	+++	++	++	+	++	+	+++	++
	CS0518	3	42	M	65	15:15	+	+	++	+	+	-	-	-
	nhbm 010	0-1	45	M	67	6:05	+++	++	++	+	+++	+++	+++	++
	CS0539	3	44	H	68	4:00	+	-	+	-	++	-	++	-
	CS0413	2	41	H	71	10:15	+	+	++	-	++	-	-	-
	CS0601	3	n/d	M	72	7:00	+	+	+++	-	++	+	++	+
	CS0643	3	42	M	72	17:00	++	+	++	+	+	-	+	+
	CS1334	1	40 +/- 2	H	73	7:00	+	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
	CS1438	3	40	H	85	5:30	n/d	n/d	n/d	n/d	+	n/d	n/d	n/d
	BCPA 305	n/d	n/d	H	n/d	n/d	+++	n/d	++	-	+++	+	++	n/d
	BCPA 340	n/d	n/d	H	n/d	n/d	-	n/d	+	+	++	n/d	+	+
Casos control	Código	Neuropatología	Sexo	Edad	IPM	HT7	RD4	Tau 5	RD3	HT7	RD4	Tau 5	RD3	
	nhbm 009	n/d	H	30	<24:00	-	-	-	n/d	n/d	n/d	-	n/d	
	CS0320	Sin neuropatología	M	37	13:30	-	n/d	-	-	-	-	-	-	
	nhbm 004	n/d	M	39	<12:00	-	-	-	n/d	+	-	-	+	
	nhbm 005	n/d	M	44	<12:00	-	-	-	-	-	-	-	-	
	CS0334	Hipoxia cerebelar	H	53	<24:00	-	n/d	n/d	n/d	-	n/d	-	-	
	nhbm 003	n/d	H	55	<12:00	-	-	-	-	-	-	-	-	
	BCPA 177	n/d	M	58	n/d	+	+	-	n/d	-	+	+	+	
	CS1468	Alfa-sinucleína Braak1 + NFT olfactory Braak2	H	64	10:00	-	n/d	n/d	n/d	-	n/d	n/d	n/d	
	nhbm 007	n/d	M	68	<24:00	+	-	-	-	-	-	-	-	
	CS0352	Cambios hipóxicos	M	70	5:00	-	-	n/d	-	-	-	+	++	
	CS0380	Placas difusas	M	72	6:00	-	-	n/d	+	++	-	-	-	
	nhbm 001	n/d	H	72	n/d	-	-	-	n/d	-	-	-	-	
	CS0499	Sin neuropatología	M	74	3:40	-	-	n/d	-	-	-	-	-	
	CS1201	Dilatación ventricular+ encefalopatía vascular	M	74	8:25	-	n/d	n/d	n/d	-	n/d	n/d	n/d	
	CS0368	Placas de amiloide	H	76	17:00	-	-	-	-	-	-	-	-	
	CS0358	Cuerpos de Lewy aislados	M	77	23:00	-	-	-	-	-	-	-	-	
	BCPA 343	n/d	H	77	n/d	+	-	+	n/d	-	n/d	-	+	
	CS1378	Leucoencefalopatía multiinfarto, demencia vascular	H	78	6:00	-	n/d	n/d	n/d	-	n/d	n/d	n/d	
	CS0695	Demencia vascular	H	80	10:00	n/d	n/d	n/d	n/d	-	n/d	n/d	n/d	
	CS0810	Sin neuropatología	M	81	23:30	-	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	
	nhbm 002	Placas de amiloide y tangles	M	83	<48:00	-	-	+	n/d	-	-	-	-	
	nhbm 008	Tangles esporádicos	M	84	<12:00	-	-	+	n/d	-	-	-	+	
	nhbm 006	Placas de amiloide y tangles	H	96	<12:00	-	-	-	-	-	-	-	-	

Además de los TNRs, los tres anticuerpos detectan unos depósitos granulares citoplásmicos de Tau que frecuentemente forman anillos perinucleares en neuronas estriatales y corticales de pacientes de la EH (Figura 31) y que son mucho menos abundantes en las secciones de sujetos control.

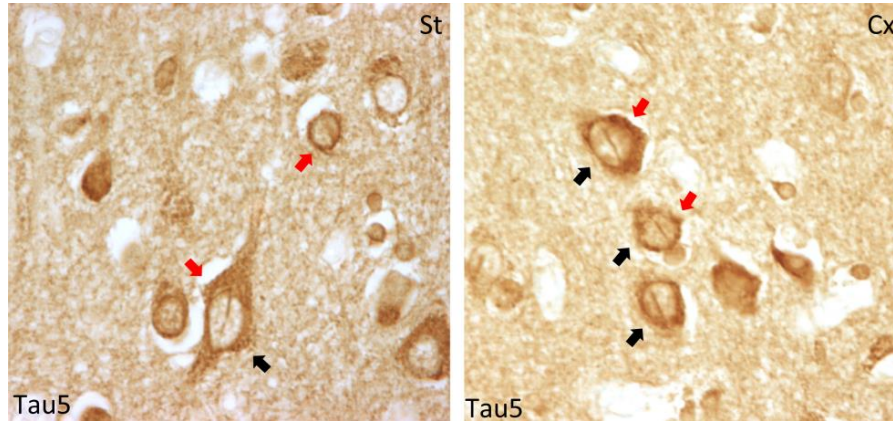


Figura 31: Tau nuclear rods (TNRs) y anillos perinucleares en pacientes de la EH. Tau nuclear rods (TNRs) y anillos perinucleares detectados mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo Tau5 en estriado (St) y corteza (Cx) en secciones de cerebro de pacientes de la EH. Las flechas negras indican neuronas con TNRs y las flechas rojas indican neuronas con anillos perinucleares.

Tras este hallazgo, nos preguntamos si los TNRs encontrados en el cerebro de pacientes de la EH, podrían ser encontrados en el cerebro de pacientes de una tauopatía clásica como por ejemplo, la Enfermedad de Alzheimer (EA). Para ello, teñimos el hipocampo de diez casos de EA con RD4, Tau5 y HT-7 (Figura 32). Como se puede ver, los TNRs también están presentes en el hipocampo de pacientes de la EA pero sólo en los casos de pacientes de EA que presentan estadios de Braak temprano.

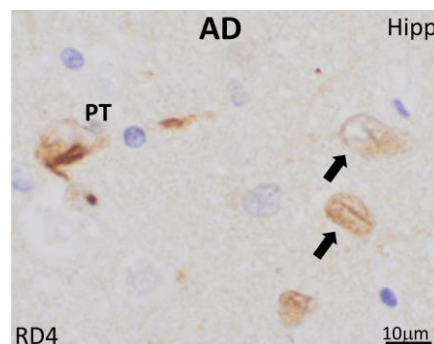


Figura 32: Descubrimiento de los Tau-nuclear rods (TNRs) en cerebros de pacientes de la EA. Inmunohistoquímica con RD4 en el hipocampo (Hipp) de cerebros de los pacientes de la EA. Las flechas indican neuronas con TNRs, PT: neurona con pre-ovillo.

En las tauopatías clásicas como PSP o PiD, en las que se produce un desbalance en las isoformas de Tau hacia un predominio de las isoformas Tau-4R o, un predominio de las Tau-3R respectivamente, las marcas histopatológicas de Tau asociadas, no están compuestas exclusivamente por las isoformas Tau-4R o Tau-3R, por lo que vimos evidente, que los TNRs encontrados en el estriado y en la corteza de los pacientes de EH pudieran contener también Tau-3R. Mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo RD3, observamos que los TNRs también estaban formados por Tau-3R (Figura 33 y Tabla 6).

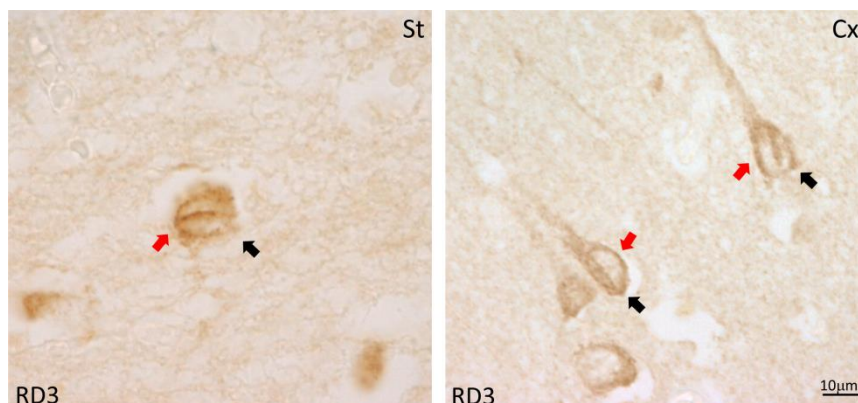


Figura 33: Los Tau nuclear rods (TNRs) también contienen Tau-3R. Inmunohistoquímica con anticuerpo RD3 en estriado (St) y corteza (Cx) de secciones de cerebro de EH. Las flechas negras indican neuronas con TNRs y las flechas rojas indican neuronas con anillos perinucleares. La barra de escala corresponde a 10 μ m.

De manera similar, cuando hicimos una extracción con Sarkosyl de la fracción soluble e insoluble de Tau de muestras de corteza de pacientes de la EH y de sujetos control y las comparamos, además de revelar que se produce un aumento de la cantidad de Tau en la fracción insoluble respecto a la soluble en la EH respecto a las muestras control (Figura 34A), también confirmamos la presencia de las isoformas Tau-3R y Tau-4R en la fracción insoluble (Figura 34B). Sin embargo, la cantidad de Tau insoluble en los pacientes de EH fue mucho menor que lo que se observa típicamente en los pacientes de EA (Figura 34B) y no contiene Tau fosforilado (Figura 34C).

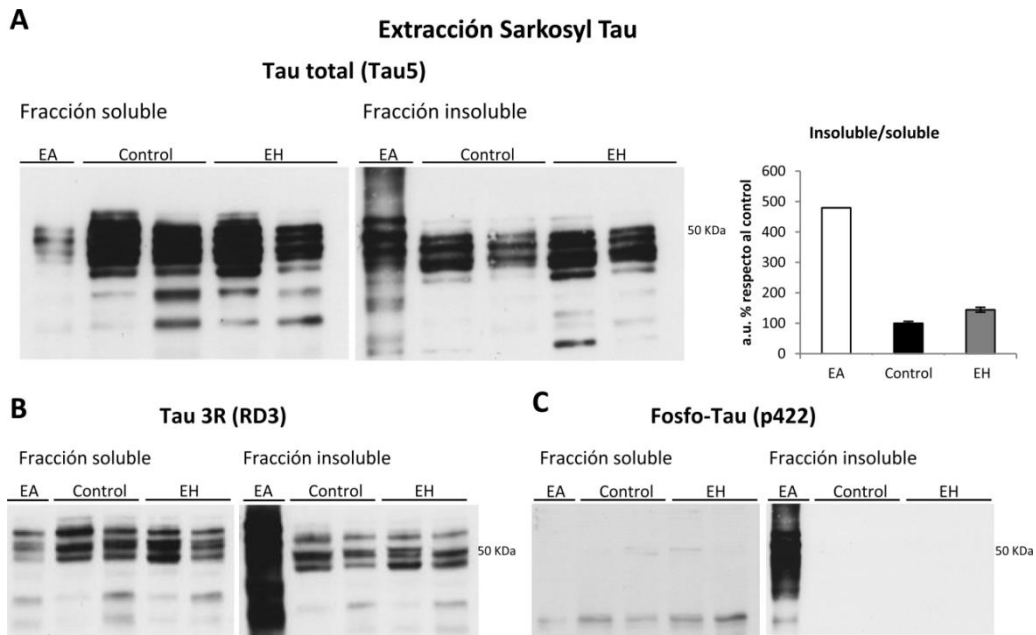


Figura 34: Análisis del Tau insoluble en sarkosyl y de Tau fosforilado en cerebro de pacientes de EH. Extracción en Sarkosyl de muestras de corteza de EA (n=1), control (n=2) y EH (n=2) que fueron analizadas con el anticuerpo que detecta Tau total Tau5 (A), anticuerpo anti-RD3 (B) y anticuerpo anti-p422 (C).

Esto último era esperable porque Tau a diferencia de lo observado en modelos de ratón de la EH, no está hiperfosforilado en la corteza de los pacientes de la EH (Figura 35).

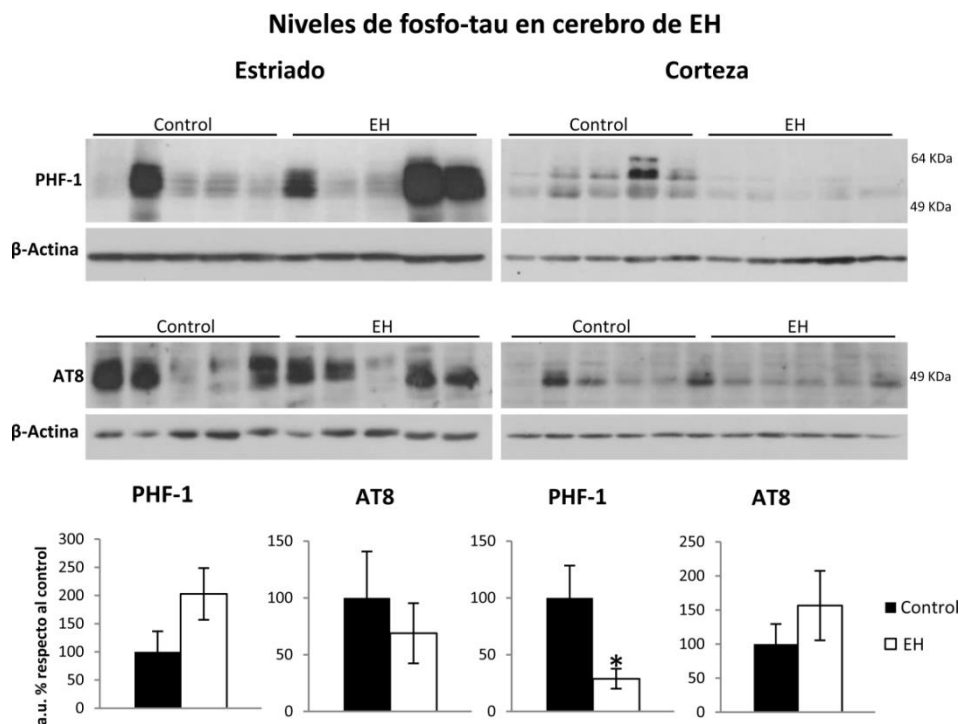


Figura 35: Análisis de Tau fosforilado en el cerebro de la EH. Análisis mediante Western blot con anticuerpos que detectan específicamente Tau fosforilado PHF-1 y AT8 en estriado y corteza (n=9-10 para estriado y n=12-13 para corteza; test U-Mann-Whitney; ** p<0.01).

De acuerdo con esto, no fuimos capaces de detectar los TNRs por inmunohistoquímica con anticuerpos que reconocen epítomos de Tau fosforilado como AT8 y PHF-1 (no mostrado). Sin embargo, mediante la inmunohistoquímica con el anticuerpo T22 que detecta Tau en su forma agregada en forma de oligómeros sí fuimos capaces de encontrar TNRs en el cerebro de pacientes de EH (Figura 36).

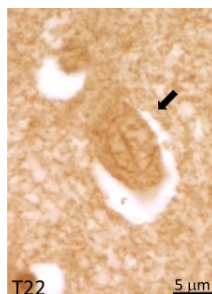


Figura 36: Detección de TNRs con anticuerpo que detecta Tau en forma de oligómeros en el cerebro de la EH. Inmunohistoquímica con anticuerpo T22 en la corteza de cerebro de EH. La barra de escala corresponde a 5 μ m.

La forma y la localización de los TNRs, nos sugirieron que podrían coincidir con las indentaciones neuronales nucleares que fueron detectadas mediante microscopía electrónica a principio de los años 80 (previamente a la identificación de la mutación responsable de la EH) en la corteza frontal y en el estriado de los casos de EH, pero no en sujetos control sin movimientos coreicos (Bots and Bruyn, 1981, Roos and Bots, 1983) y también descritos en pacientes de DRPLA (Takahashi et al., 2001) y en modelos celulares y de ratón de algunas enfermedades causadas por expansiones de poliglutamina (Evert et al., 1999, Zander et al., 2001, Diaz-Hernandez et al., 2003). Para confirmar que realmente los TNRs atraviesan el espacio nuclear de las neuronas, hicimos un análisis mediante microscopía confocal en secciones procedentes de pacientes de EH a las que previamente habíamos hecho inmunofluorescencia con el anticuerpo HT-7 y contra-tinción nuclear con DAPI (Figura 37).

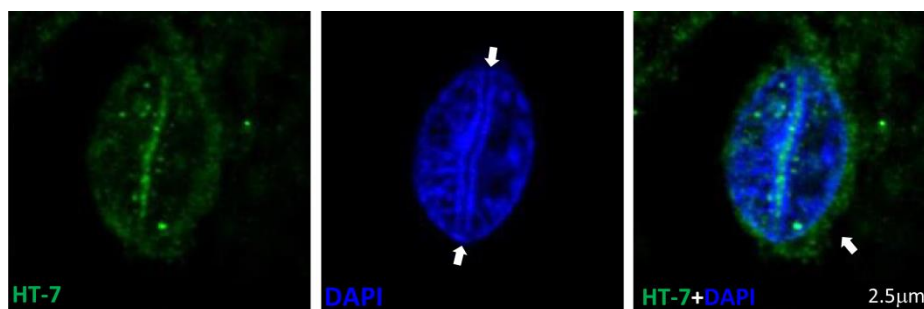


Figura 37: Detección de los Tau-nuclear rods (TNRs) y el surco que ocupan en el núcleo de neuronas de pacientes de la EH. Inmunofluorescencia con HT-7 (verde) y contra-tinción nuclear con DAPI (azul) en neurona cortical de paciente de la EH. La flecha blanca indica los finales de un surco nuclear que contiene un TNR positivo para Tau. La barra de escala corresponde a 2.5 μ m.

Como podemos ver en la figura, la tinción con DAPI reveló la presencia de un surco en el núcleo de la neurona, que se rellena con el TNR positivo para HT-7. Seguidamente, hicimos un análisis mediante microscopía electrónica que nos permitió confirmar que los TNRs ocupan indentaciones neuronales y, que además, presentan una ultraestructura de aspecto filamentososo (Figura 38).

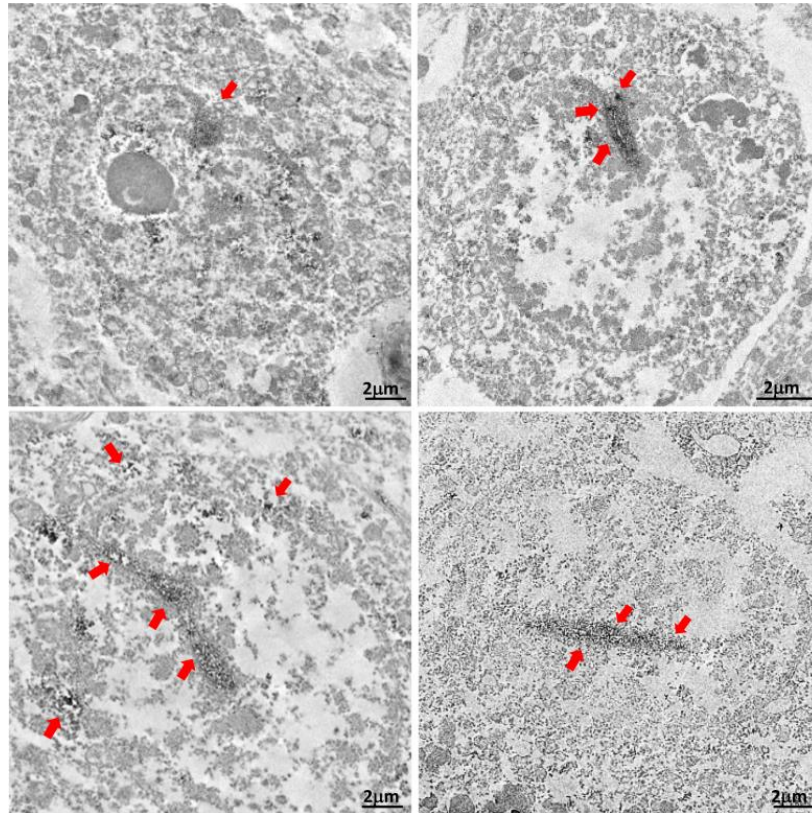


Figura 38: Detección de indentación nuclear rellena de Tau en el cerebro de la EH. Análisis mediante microscopía inmuno-electrónica de neuronas de pacientes de la EH con TNRs positivos para HT-7. Las flechas rojas indican precipitado de DAB. Notar la ultra estructura filamentososa ordenada del material inmunoteñido relleno las indentaciones nucleares. La barra de escala corresponde a 2 μ m.

Mediante coimmunoprecipitación, comprobamos que Tau y la Htt no interaccionan (Figura 39) y, que ambas proteínas están restringidas a sus respectivos depósitos, Tau en los TNRs y, la Htt en los esféroides cuerpos de inclusión (IBs). Sin embargo, ambas marcas histopatológicas coinciden en algunas neuronas. La doble inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Tau (HT-7) y anti-ubiquitina que revela que en la corteza de un caso de la EH, el 25.6% de las neuronas que contienen TNRs también presentan IBs nucleares positivos para ubiquitina y, que el 21.4% de las neuronas con IBs nucleares positivos para ubiquitina también muestran TNRs (Figura 39).

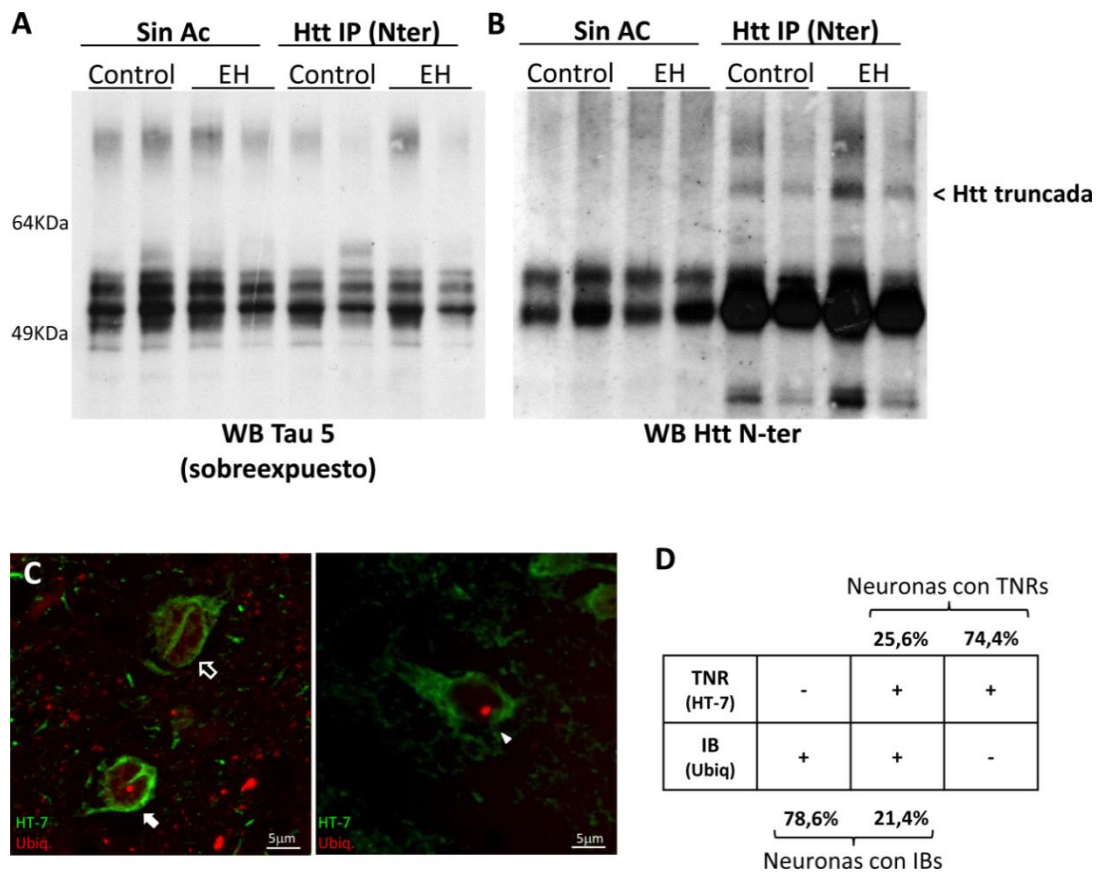


Figura 39: No existe interacción directa entre la HTT y Tau en el cerebro de la EH. (A-B) La HTT y Tau no coinmunoprecipitan en el estriado de humanos **(A)** Western-blot contra Tau 5 después de la inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Htt N-terminal. Las exposiciones cortas no nos proporcionaron ninguna señal. Las bandas de Tau 5 obtenidas después de una larga exposición eran similares con o sin anticuerpo sugiriendo una unión inespecífica de Tau a la matriz. **(B)** Western blot con anticuerpo anti-Htt mostraba la presencia de Htt N-terminal después de la inmunoprecipitación. **(C)** Mediante inmunofluorescencia en secciones de cerebro de EH, los anticuerpos de Tau y Ubiquitina detectan marcas histopatológicas independientes, TNRs e IBs respectivamente. **(D)** Cuantificación del ratio de coincidencia de ambas marcas en neuronas corticales de un caso de EH.

5.2.1. Análisis de la posible presencia de TNRs en otras enfermedades causadas por expansiones CAG

Una pregunta que nos surgió tras los resultados obtenidos, era que si éramos capaces de detectar alteraciones en Tau incluida la presencia de TNRs en otras enfermedades neurodegenerativas causadas por expansiones de CAG. Para ello, hicimos inmunohistoquímica con el anticuerpo HT-7 en secciones de cerebelo de un número limitado de casos de SCA1 y SCA3 (Figura 40). Como podemos ver en la figura, no detectamos la presencia de TNRs en el

cerebelo de casos de SCA1 y SCA3. Si las alteraciones observadas en Tau son específicas para la EH, pudiera ser la razón por la que a diferencia de las SCAs, la EH presenta alteraciones en el movimiento dependiente del circuito de los ganglios basales y demencia cortical.

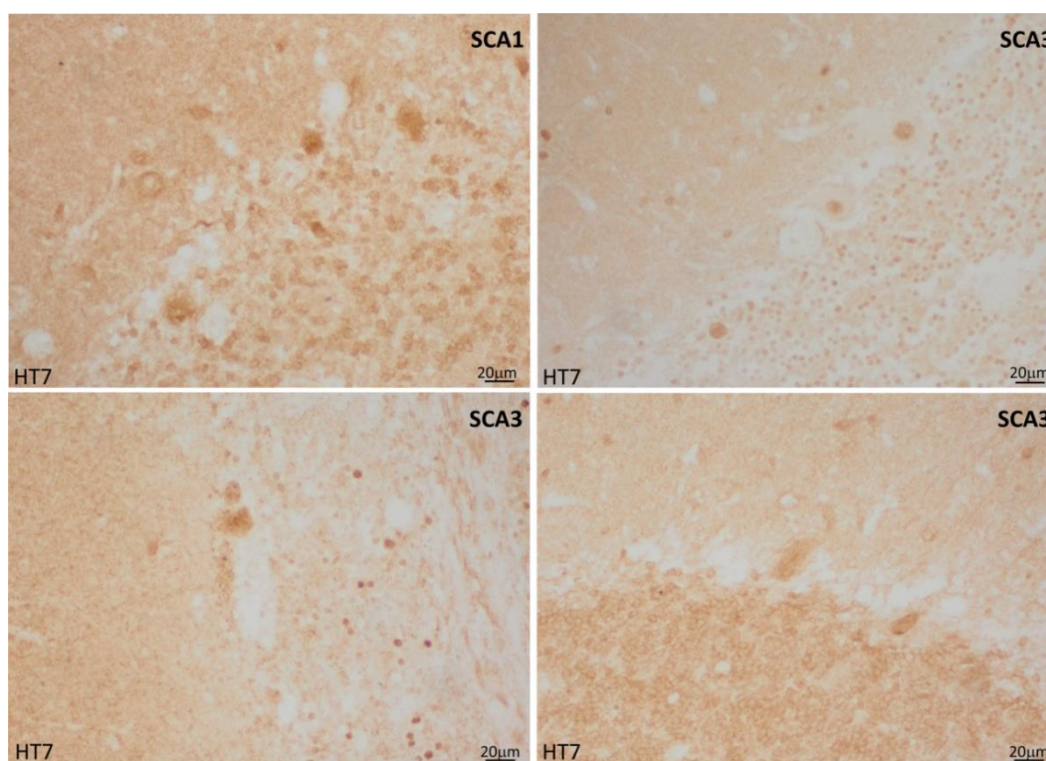


Figura 40: Ausencia de TNRs en SCAs. Los TNRs no se detectan en el cerebelo de un número limitado de casos analizados de otras enfermedades causadas por expansión del trinucleótido CAG como SCA1 ($n=1$) y SCA3 ($n=3$). Inmunohistoquímica con HT-7. La barra de escala corresponde a 20 μ m.

5.3. El factor de *splicing* SRSF6 que regula el exón 10 de Tau está alterado en la Enfermedad de Huntington

Seguidamente nos propusimos explorar el mecanismo por el cual, la expansión del triplete CAG en la Htt mutada produce la alteración descrita en el *splicing* del exón 10 de Tau. Recientemente, ha sido descrito por el grupo de Bates, mediante aproximaciones de biología molecular que, el factor de *splicing* SRSF6 (también conocido como SRp55), sería capaz de unirse a las repeticiones de CAG en el ARNm de la Htt mutada pues encaja con su secuencia consenso YRCRKM (T/C,A/G,C,A/G,G/T,A/C) (Sathasivam et al., 2013). Poco después, el grupo de Krainer ha reportado una extensión de esta secuencia consenso de los mencionados 6 a otra de 9 nucleótidos en la que al menos los últimos 8 se ajustan bastante bien a CAGCAGCA (Jensen et al., 2014). Por otro lado, se conoce que SRSF6 es un buen modulador del *splicing*

alternativo del exón 10 de Tau (Yin et al., 2012). Mediante inmunohistoquímica observamos que SRSF6 se acumula en IBs nucleares (Figura 41A) y, mediante doble inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-SRSF6 y EM48, demostramos que son los IBs que forma la Htt mutada (figura 41A). Mediante *Western blot* pudimos ver que, el nivel total de SRSF6 está incrementado en los pacientes de la EH con la aparición de una banda de mayor peso molecular que corresponde a un incremento del nivel de SRSF6 fosforilado (Figura 41B) como pudimos ver mediante el *Western blot* con el anticuerpo 1H4 que reconoce proteínas SR fosforiladas (Figura 41B). Con esto, podemos afirmar que SRSF6, está alterado en la EH.

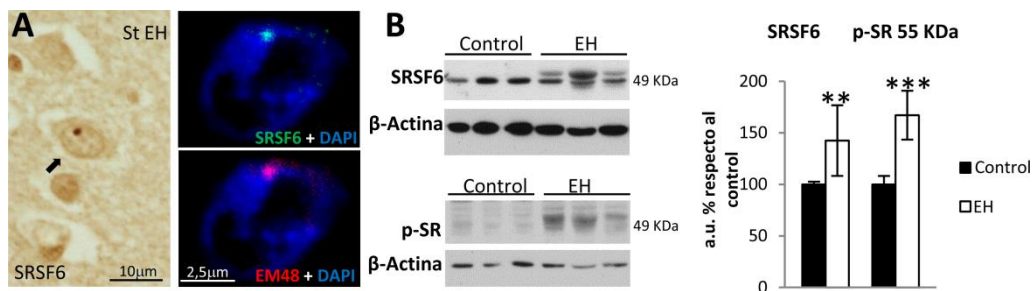


Figura 41: Cambios en el factor de splicing SRSF6 en cerebros de pacientes de la EH. (A) Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-SRSF6 en secciones de estriado de pacientes de la EH (la flecha indica una neurona con inclusión positiva para SRSF6 y la barra de escala corresponde a 10 µm) y, doble inmunofluorescencia con anticuerpos anti-SRSF6 (verde) y anti-Htt EM48 (rojo) mostrando la acumulación de SRSF6 en IBs de Htt mutada (la barra de escala corresponde a 2.5 µm). (B) Análisis mediante *Western blot* de SRSF6 y proteínas fosfo-SR (p-SR, con anticuerpo 1H4) en homogenados totales de estriado de homogenados de controles y de pacientes de la EH (n=8; test t-Student; ** p<0.01, *** p<0.001).

Recientemente, se ha descrito que SRSF6 favorece la producción de Tau-4R en células humanas SH-SY5Y procedentes de un neuroblastoma (Yin et al., 2012). Sabiendo esto, transfectamos estas células con GFP fusionada al fragmento N-terminal de la Htt sin y con la mutación. Cuando transfectamos las células con la Htt mutada, observamos que se producía una tendencia a incrementar el ratio 4R/3R a nivel de ARNm. Al co-transfectar las células con el factor de *splicing* SRSF6 junto a la Htt mutada, vimos que, este incremento en el ratio se magnifica y pasa a ser estadísticamente significativo (p<0.05) (Figura 42).

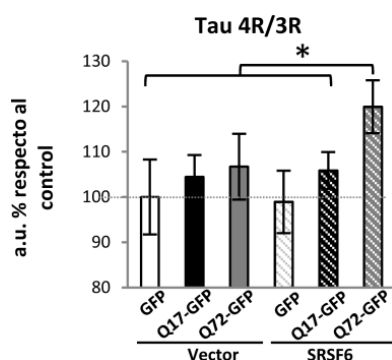


Figura 42: Incremento del ratio 4R/3R de las isoformas de Tau a nivel de ARNm en células transfectadas SH-SY5Y. Análisis por RT-PCR del ARNm de las isoformas de Tau-3R y de Tau-4R en SH-SY5Y después de la transfección (n=8; ANOVA seguido de DMS; * p<0.05).

5.4. Alteración de SRSF6, desbalance del ratio de isoformas de Tau, incremento del nivel de Tau total y, detección de TNRs en el ratón modelo de Enfermedad de Huntington

En primer lugar, confirmamos que los ratones R6/1 muestran alteraciones del factor de *splicing* SRSF6, similares a las que pudimos ver en los pacientes de la EH como, la acumulación en IBs de Htt mutada mediante inmunohistoquímica y doble inmunofluorescencia y, un incremento significativo de la fosforilación mediante *Western Blot* ($p=0.0014$) (Figura 43).

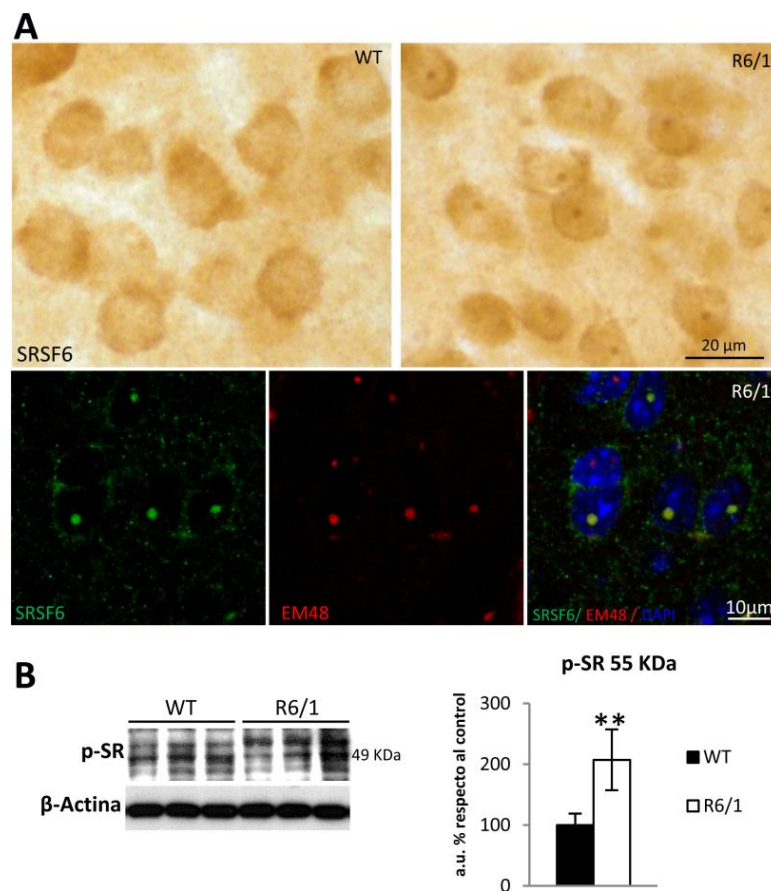


Figura 43: Alteraciones en SRSF6 (presencia en IBs e incremento de su fosforilación) en ratones modelo de EH. (A) Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-SRSF6 en el estriado de ratones de 3.5 meses de edad WT y R6/1 y doble inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-SRSF6 (verde) y anti-Htt EM48 (rojo) mostrando la acumulación de la Htt en los IBs. Las barras de escala corresponden a 20 μ m y a 10 μ m para la inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia respectivamente. **(B)** Análisis por Western blot de fosfo-Sr usando el anticuerpo 1H4 (p-SR) en estriado de ratones de 3.5 meses WT y R6/1 ($n=6$; test t-Student; ** $p<0.01$).

Después verificamos que, aunque los ratones expresan predominantemente las isoformas de Tau-4R en el estado adulto (Kosik et al., 1989, Takuma et al., 2003), los ratones R6/1 muestran una tendencia a incrementar el ratio 4R/3R a nivel de ARNm y proteína en el estriado y en la corteza (Figura 44A). Los ratones R6/1 muestran un incremento significativo de Tau-4R a nivel del proteína en el estriado respecto a los WT (1.41 veces de incremento, $p=0.04$) y, también muestran un aumento significativo en los niveles de Tau total respecto a los ratones WT en el estriado y en la corteza (1.42 veces de incremento, $p=0.04$ y 1.49 veces de incremento, $p=0.02$; respectivamente) (Figura 44B).

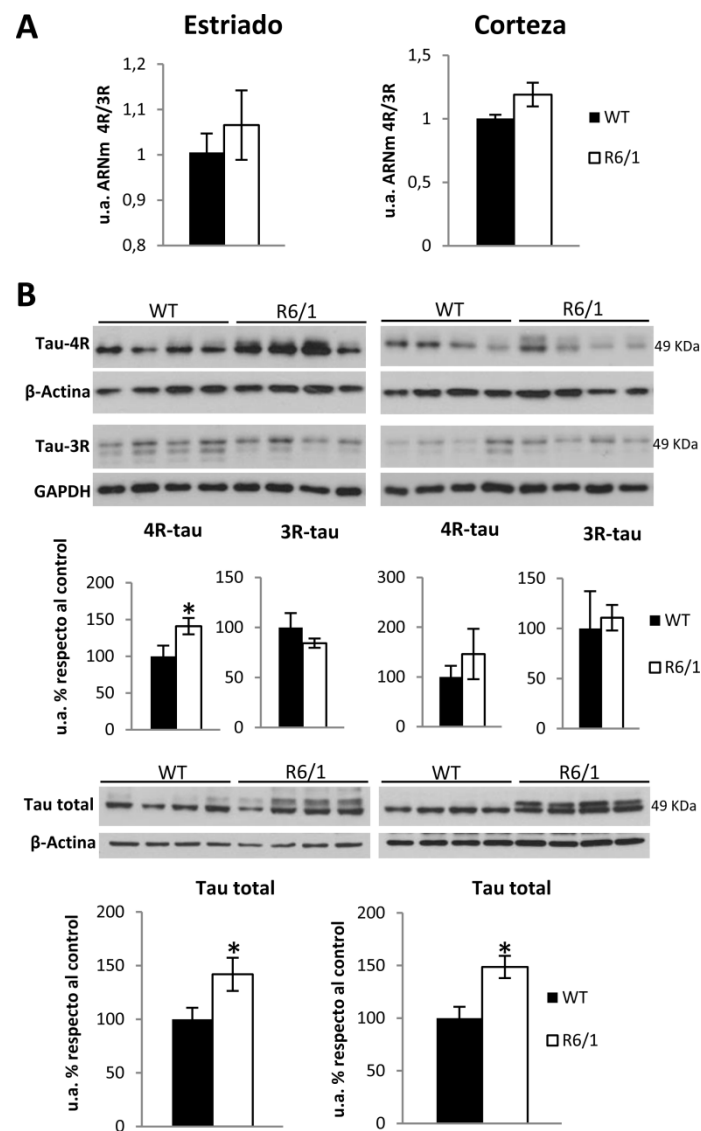


Figura 44: Incremento de Tau-4R y Tau total a nivel de proteína. (A) Análisis por RT-PCR cuantitativa de las isoformas Tau-3R y Tau-4R a nivel de ARNm en el estriado y la corteza de ratones R6/1 de 3.5 meses de edad ($n=5-7$). **(B)** Análisis mediante Western blot de las isoformas Tau-3R y Tau-4R con los anticuerpos específicos RD3 y RD4 y de Tau total con el anticuerpo 7.51 en el estriado y la corteza de ratones WT y R6/1 ($n=7$; test t-Student; * $p<0.05$).

Obtuvimos resultados similares con el ratón modelo HD94 que muestra un fenotipo que progresa de forma más lenta y que tiene mayor esperanza de vida que los ratones R6/1. Observamos que se produce incremento en Tau total en la corteza de ratones HD94 a 20 meses de edad que también muestran un incremento significativo del ratio 4R/3R tanto en el estriado como en la corteza (Figura 45).

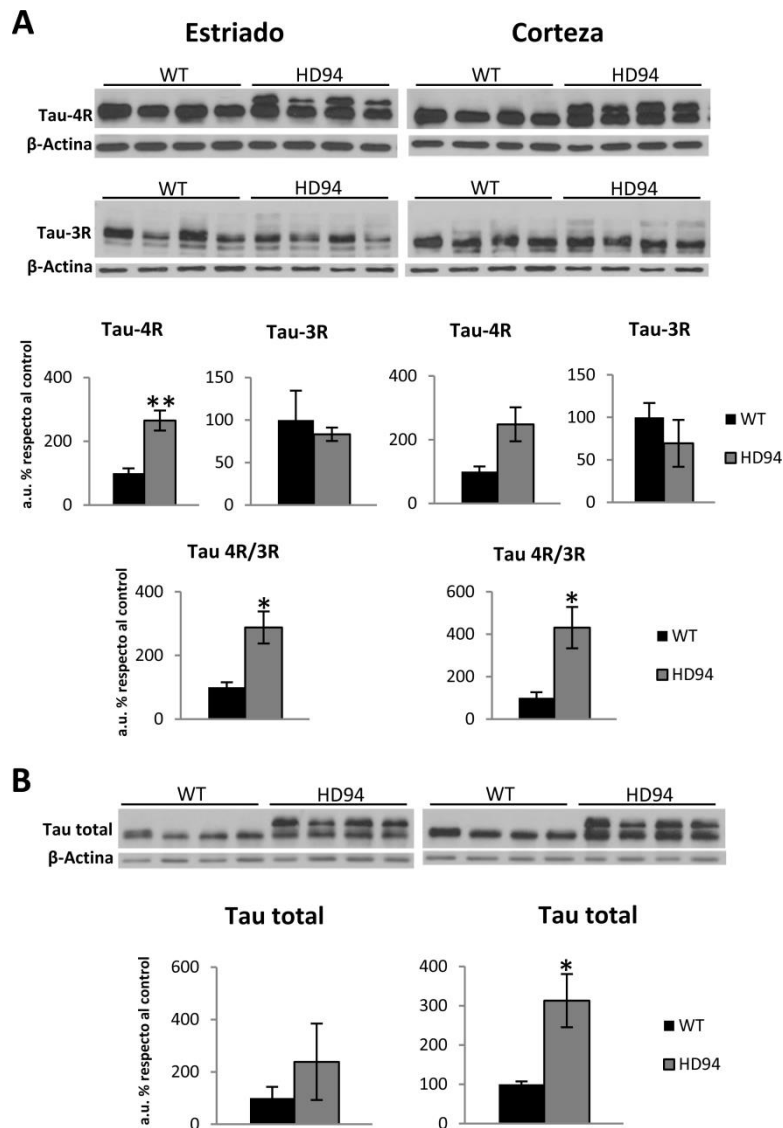


Figura 45: Incremento de Tau-4R, del ratio de proteína 4R/3R y de Tau total en el estriado y la corteza del ratón transgénico HD94. Análisis mediante Western blot de las isoformas Tau-3R y Tau-4R con los anticuerpos específicos RD3 y RD4 (**A**) y Tau total con el anticuerpo Tau 5 (**B**) en homogenados totales de estriado y corteza de ratones WT y HD94 (n=4-6; test t-Student; * $p < 0.05$ y test U-Mann-Whitney; * $p < 0.05$).

Mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo HT-7 e inmunohistoquímica con el anticuerpo Tau 5, pudimos observar que los TNRs también están presentes en el cerebro de los ratones R6/1 y HD94 (Figura 46), aunque son mucho menos frecuentes que en humanos.

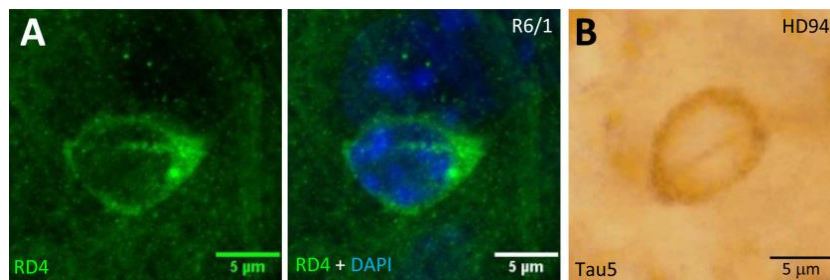


Figura 46: Detección de TNRs en dos modelos murinos de la EH. (A) Inmunofluorescencia con el anticuerpo RD4 (verde) y contra-tinción nuclear con DAPI (azul) mostrando un TNR en una neurona de un R6/1. La barra de escala corresponde a 5 µm. **(B)** Detección de un TNR mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo Tau 5 en una neurona del ratón HD94. La barra de escala corresponde a 5 µm.

6. Análisis del efecto de la reducción genética de Tau en el modelo de ratón de la Enfermedad de Huntington R6/1

Para explorar si el incremento del ratio 4R/3R de las isoformas de Tau y, el evidente incremento del nivel de Tau total en los ratones R6/1, contribuye a la patogénesis de la EH, decidimos llevar los ratones R6/1 a un fondo heterocigoto ($Mapt^{+/-}$) y a un fondo homocigoto ($Mapt^{-/-}$) deficiente para el gen de Tau (Figura 47).

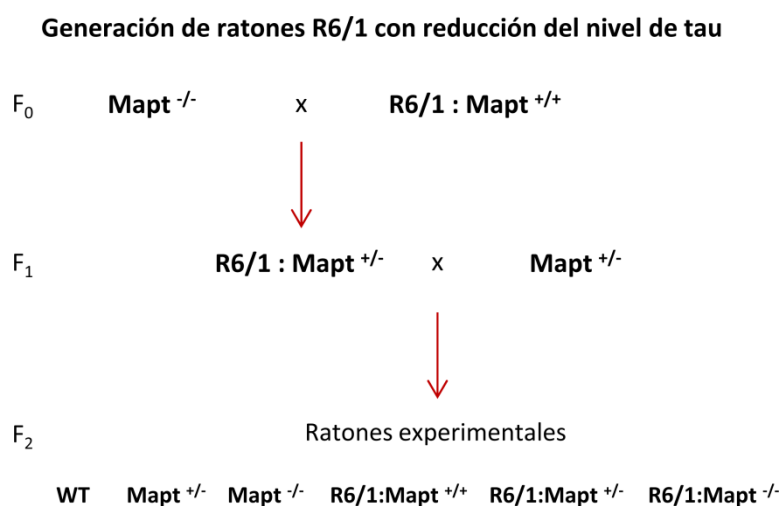


Figura 47: Generación de ratones R6/1 con disminución del nivel de Tau. Representación esquemática del protocolo de cruces para obtener ratones R6/1 con reducción parcial o total de Tau.

Después de cruzar el ratón $Mapt^{+/-}$ con el ratón $R6/1:Mapt^{+/-}$, obtuvimos los siguientes genotipos experimentales: $Mapt^{+/+}$; $Mapt^{+/-}$; $Mapt^{-/-}$, $R6/1:Mapt^{+/+}$; $R6/1:Mapt^{+/-}$ y $R6/1:Mapt^{-/-}$. La descendencia se distribuyó entre los diferentes genotipos de forma mendeliana. En primer lugar, verificamos mediante Western blot con anticuerpo que reconoce Tau total, que los ratones $R6/1:Mapt^{+/-}$ y $R6/1:Mapt^{-/-}$ mostraban una reducción parcial y absoluta de los niveles de Tau respectivamente (Figura 48).

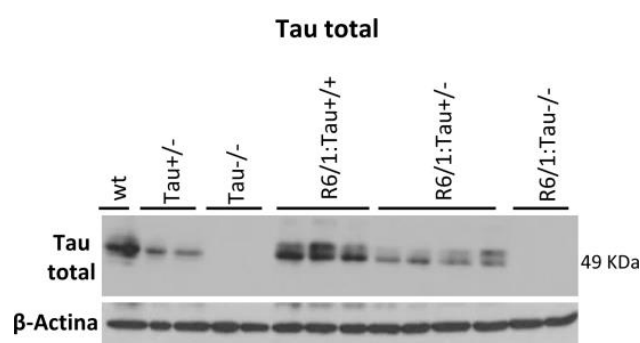


Figura 48: Detección del nivel de Tau total en ratones R6/1 con reducción genética de Tau. Análisis mediante Western blot de Tau total (anticuerpo 7.51) en estriado de ratones wt; $Mapt^{+/-}$; $Mapt^{-/-}$; $R6/1:Mapt^{+/+}$; $R6/1:Mapt^{+/-}$ and $R6/1:Mapt^{-/-}$.

A continuación, hicimos análisis histopatológico de los ratones para analizar como la reducción parcial o total de Tau afectaba a los hallazgos anteriormente descritos. En primer lugar, confirmamos que los TNRs también se detectan en los ratones $R6/1:Mapt^{+/-}$ pero no en los ratones $R6/1:Mapt^{-/-}$ como esperábamos (Figura 49A). Observamos que la dosis del gen *Mapt* no afectaba al número de IBs de Htt mutada presentes en el estriado aunque presentaban una reducción de su tamaño en los ratones $R6/1:Mapt^{+/-}$ y $R6/1:Mapt^{-/-}$ (Figura 49B). Finalmente, analizamos que la detección de SRSF6 en los IBs y, el número de células inmunopositivas para caspasa 3 activa como indicador de procesos de apoptosis que se estuvieran produciendo en el estriado, y vimos que no estaba afectado por la reducción parcial o total de Tau en los ratones R6/1 (Figura 49C).

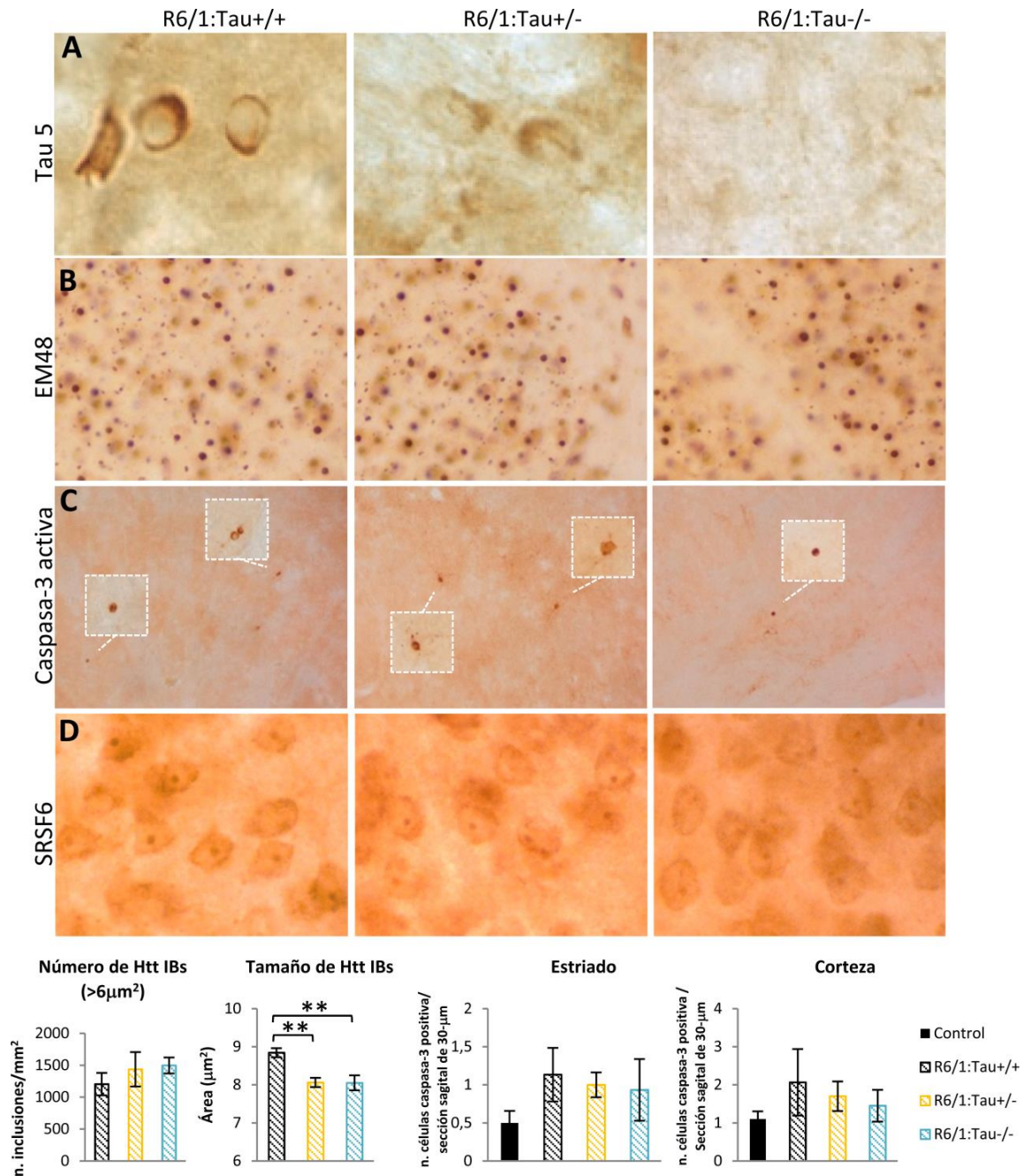


Figura 49: Análisis del efecto del knockdown de Tau en los TNRs, en los cuerpos de inclusión de Htt (IBs), la apoptosis y las inclusiones SRSF6 positivas en ratones R6/1 a 6.5 meses de edad. (A) Como esperábamos, la inmunohistoquímica con Tau 5, reveló que los TNRs no se detectan en el estriado de los ratones R6/1:Tau-/-. **(B)** Inmunohistoquímica con EM48 para detectar cuerpos de inclusión estriatales de Htt. No encontramos diferencias significativas en el número de agregados. Sin embargo, los ratones R6/1:Tau+/- y R6/1:Tau-/- mostraron una disminución del tamaño de las inclusiones de Htt mutada (ANOVA, seguido por DMS; ** $p < 0.01$). **(C)** Inmunohistoquímica de caspasa 3 activa. Los ratones R6/1:Tau+/- y R6/1:Tau-/- mostraron menor número de caspasa-3 activa positivas en la corteza, aunque las diferencias no fueron significativas. **(D)** Inmunohistoquímica anti-SRSF6 en corteza la cual reveló ausencia de diferencias entre los genotipos.

Por último, en lo que se refiere a los análisis funcionales de los ratones R6/1, la pérdida de peso progresiva que presentan estos ratones modelo de EH era similar en los ratones R6/1:*Mapt*^{+/-} y R6/1:*Mapt*^{-/-} (Figura 50).

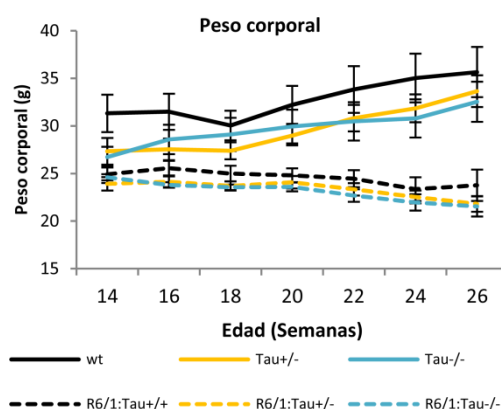


Figura 50: Análisis del peso corporal de los ratones wt; *Mapt*^{+/-}; *Mapt*^{-/-}, R6/1:*Mapt*^{+/+}; R6/1:*Mapt*^{+/-} y R6/1:*Mapt*^{-/-}. Evolución del peso corporal de ratones WT (n=9); *Mapt*^{+/-} (n=19); *Mapt*^{-/-} (n=5); R6/1:*Mapt*^{+/+} (n=12); R6/1:*Mapt*^{+/-} (n=17) y R6/1:*Mapt*^{-/-} (n=9).

Finalmente, se caracterizó el comportamiento motor en el aparato de rotarod con aceleración para evaluar la coordinación motora. Pudimos observar que los ratones R6/1:*Mapt*^{+/-} y los R6/1:*Mapt*^{-/-} realizan mejor el test de rotarod que los R6/1:*Mapt*^{+/+} a edades sintomáticas tempranas (12 semanas) y a las plenamente sintomáticas (16 semanas) (Figura 51A). De forma similar, la hipoactividad significativa observada en los ratones R6/1:*Mapt*^{+/+} a edades sintomáticas, evidenciada por una disminución en la distancia ambulatoria recorrida y en el número de veces que el animal se pone en posición vertical, se veía atenuada en los ratones R6/1:*Mapt*^{+/-} y R6/1:*Mapt*^{-/-} (Figura 51B).

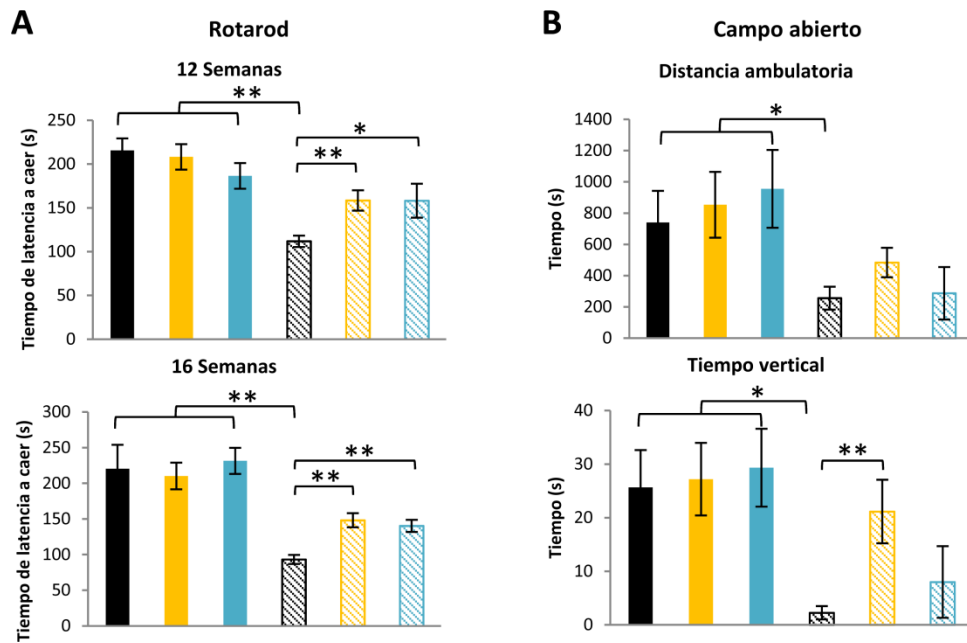


Figura 51: Atenuación del déficit motor mediante la reducción genética de Tau. (A) Evolución de la coordinación motora en el test de aceleración en el Rotarod de ratones wild type (wt, n=5); $Mapt^{+/-}$ (n=9); $Mapt^{-/-}$ (n=5); $R6/1:Mapt^{+/+}$ (n=6); $R6/1:Mapt^{+/-}$ (n=14) and $R6/1:Mapt^{-/-}$ (n=8) a 12 y 16 semanas de edad. (B) Test de campo abierto de ratones WT (n=9); $Mapt^{+/-}$ (n=11); $Mapt^{-/-}$ (n=3); $R6/1:Mapt^{+/+}$ (n=8); $R6/1:Mapt^{+/-}$ (n=13) y $R6/1:Mapt^{-/-}$ (n=4) a 25 semanas de edad (ANOVA, seguido por DMS o Games Howell; ** $P < 0.01$, * $p < 0.05$; y Kruskal Wallis, seguido por el test post-hoc U-Mann Whitney con la corrección de Bonferroni; * $p < 0.008$).

Los resultados observados en ambos test de comportamiento, demuestran que Tau contribuye al fenotipo motor de los ratones de la EH.

DISCUSIÓN

La Enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo de los más frecuentes dentro de las enfermedades raras. Su alta prevalencia hace importante la necesidad de centrar esfuerzos en comprender cómo la mutación descrita en 1993 es capaz de provocar un fenotipo tan atroz en los pacientes de esta enfermedad para abrir posibles vías de intervención terapéutica.

En esta tesis, nos hemos centrado en el estudio de GSK-3, una de las proteínas que por su implicación en numerosas enfermedades, ha suscitado interés en el desarrollo de fármacos o terapias que puedan modular su actividad. Por otro lado, en la literatura había una serie de incongruencias entre los efectos de los inhibidores de GSK-3 en modelos celulares y animales y evidencias previas que indicaban que la actividad GSK-3 podría estar alterada en la EH, lo cual hacía muy interesante comprender cuál era su implicación. Al mismo tiempo, como consecuencia de claves halladas en el análisis de uno de sus sustratos relacionados con la neurodegeneración, la proteína Tau, decidimos hacer un estudio de su estado en esta enfermedad en profundidad. Con todo esto, los dos principales hallazgos de esta tesis han sido, en primer lugar que GSK-3 está disminuida en la EH y que esto contribuye a la patogénesis de la enfermedad y, en segundo lugar que la EH puede ser englobada dentro del grupo de enfermedades conocidas como tauopatías ya que hemos detectado que se produce una alteración del *splicing* del gen que codifica la proteína Tau a favor de las isoformas Tau-4R y que aparecen unos depósitos que anteriormente no se habían detectado a los que hemos denominado *Tau nuclear rods* (TNRs).

La disminución de GSK-3 contribuye a la patogénesis de la Enfermedad de Huntington.

En primer lugar, hemos analizado por primera vez en cerebro *post-mortem* de pacientes de la EH, el nivel y la actividad de GSK-3 en el estriado, la región más afectada en la enfermedad y, además, también hemos analizado otras regiones cerebrales afectadas como la corteza y el hipocampo. Hemos encontrado que se produce una disminución dramática del nivel y la actividad de GSK-3 en el estriado y en la corteza de los pacientes de la EH. Paralelamente, en el ratón modelo de la enfermedad R6/1, hemos encontrado resultados similares. Estos hallazgos los hemos confirmado con diferentes aproximaciones, lo que nos permite afirmar que en la EH, GSK-3 está disminuida. Tras este hallazgo, nos propusimos incrementar su actividad para analizar si podría ser relevante terapéuticamente. Mediante la

combinación del ratón R6/1 con el ratón previamente generado en el laboratorio de sobreexpresión de GSK-3, hemos sido capaces de demostrar que, la mencionada disminución de GSK-3 observada, contribuye al fenotipo de la EH ya que la atrofia cerebral, la hipoactividad locomotora y, los déficits en la coordinación motora y el aprendizaje de los R6/1, son atenuados por la expresión moderada de GSK-3 transgénica en cerebro anterior de los ratones.

El primer estudio de GSK-3 relacionado con la toxicidad de la Htt mutada fue llevado a cabo en modelos celulares que expresaban el exón 1 de la Htt con 74 glutaminas (Q74-Htt) (Carmichael et al., 2002). El inhibidor no selectivo de GSK-3, litio, el inhibidor selectivo SB216763 y la sobreexpresión del plásmido dominante negativo de GSK-3, atenuaban significativamente la muerte celular inducida por la Htt-Q74 y el número de inclusiones características. Al mismo tiempo y posteriormente, se describió que en la EA se producía un incremento del nivel y de la actividad de GSK-3 (Imahori and Uchida, 1997, Pei et al., 1997, Grimes and Jope, 2001, Hye et al., 2005, Leroy et al., 2007, Hooper et al., 2008) y que la sobreexpresión transgénica de GSK-3 era capaz de causar un fenotipo neurodegenerativo similar al observado en la EA como tinción somatodendrítica de Tau hiperfosforilado en neuronas granulares y deficiencias en memoria espacial (Lucas et al., 2001, Hernandez et al., 2002). De acuerdo con esto y con la implicación del incremento de la actividad de GSK-3 en otras enfermedades, se postuló que los inhibidores de GSK-3 podrían ser neuroprotectores en una gran cantidad de modelos celulares y animales de neurodegeneración (Cohen and Goedert, 2004, Meijer et al., 2004, Noble et al., 2005, Engel et al., 2006a). De forma similar, el tratamiento con litio, sólo (Wei et al., 2001, Wood and Morton, 2003, Berger et al., 2005, Voisine et al., 2007, Watase et al., 2007) o en combinación con valproato (Chiu et al., 2011), o los inhibidores selectivos de GSK-3 como AR-A014418 (Voisine et al., 2007) eran neuroprotectores en modelos de vertebrados y roedores de la EH y otros desórdenes causados por expansiones poli-Q. En los experimentos en los que se administró sólo litio, con la excepción del ratón modelo de la EH R6/2 (Wood and Morton, 2003) que no mostró una clara mejora, mostraron una clara mejoría en la coordinación motora y en las pruebas cognitivas el modelo químico de rata de la EH (Wei et al., 2001) y el ratón modelo transgénico de otra enfermedad causada por expansión de CAG, la SCA1 (Watase et al., 2007). Además, los modelos invertebrados de la enfermedad, también mostraron que se producía una atenuación de la muerte celular inducida por la poli-Q con la administración de litio o inhibidores selectivos (Berger et al., 2005, Voisine et al., 2007). Sin embargo, todos estos estudios se llevaron a cabo sin preguntarse si los niveles o la actividad de GSK-3 estaban incrementados como consecuencia de la expresión de poli-Q.

Como hemos mencionado, el litio, es un inhibidor no selectivo de GSK-3 e inhibe muchas más actividades enzimáticas además de GSK-3 como la inositol monofosfatasa y la histona deacetilasa 1 (HDAC1) (Gould et al., 2006, Xu et al., 2013). Además, el litio por sí mismo, o en combinación con otros compuestos como la rapamicina (Sarkar et al., 2008) y el valproato (Chiu et al., 2011) se encontró que aumentaban la autofagia, lo que puede explicar que tenga un efecto beneficioso en modelos celulares y animales de toxicidad mediada por poli-Q porque esté actuando sobre otras dianas y no tanto sobre la GSK-3. Tampoco podemos pasar por alto el hecho de que el litio sí que funcione en otra enfermedad causada por expansión CAG como es la SCA1 (Watase et al., 2007) y no en la EH. Esto puede explicarse por el hecho de que la SCA1 es una enfermedad que afecta principalmente al cerebelo y, puede ser que en esta estructura, puede haber un incremento patológico de la actividad GSK-3 lo que explicaría el efecto beneficioso del litio, a diferencia de la EH en la que las regiones más afectadas se encuentran en cerebro anterior. Recientemente, se ha descrito que en el cerebelo de los pacientes de la EH el nivel de GSK-3 no está disminuido (Lim et al., 2014) que explicaría el efecto terapéuticamente diferencial de la inhibición de GSK-3 con litio en SCA1 y en la EH.

En lo que se refiere a los resultados previos sobre si la actividad de GSK-3 cambia en respuesta a la expresión de la Htt mutada, un incremento en la fosforilación de la región N-terminal fosforilado de GSK-3 fue primeramente descrito en las células estriatales *STHdh^{Q111/Q111}* (Gines et al., 2003). La fosforilación en la región N-terminal de GSK-3 hace referencia a su forma inactiva en algunos de sus escenarios funcionales, lo que sugiere que se estaría produciendo una reducción en su actividad quinasa. Un incremento similar de p-GSK-3, fue reportado en el estriado de los ratones R6/1 (Saavedra et al., 2010) y más recientemente, también en la corteza de los ratones R6/1 (Lim et al., 2014) y de los ratones R6/2 (Blum et al., 2014). Sin embargo, no se había realizado anteriormente ningún análisis directo de la actividad GSK-3 y solamente, se había descrito una correlación con el nivel de fosforilación de sus sustratos, muchos de los cuales son diana de otras quinasas y fosfatasa. Desafortunadamente, esto último, no nos proporciona realmente un indicador de cómo está la actividad quinasa debido a que ha sido descrito que en la EH, se produce una desregulación de la calcineurina (Xifro et al., 2009, Saavedra et al., 2010, Gratuze et al., 2014) y otras fosfatasa como la PHLPP1 (Saavedra et al., 2010) o las mayoritarias PP1, PP2A y PP2B (Blum et al., 2014). Esto último, podría explicarse porque está descrito que en la EH se produce una disminución de la temperatura corporal llegando a la hipotermia en los ratones modelo de la enfermedad N171-

82Q y R6/2 (Weydt et al., 2006) lo que disminuye la actividad de numerosas fosfatasa como esta descrito que tiene lugar en los períodos de hibernación de numerosos mamíferos (MacDonald and Storey, 2007) o ante situaciones en las que a los pacientes se les administra anestesia para una intervención quirúrgica y como consecuencia se produce una disminución de la temperatura corporal (Planel et al., 2007). De acuerdo con esto, la descripción aquí reportada de los niveles de GSK-3 total, el incremento de p-GSK-3 en sus epítomos inhibitorios y la disminución en su actividad enzimática es la primera demostración sólida de la disminución de la actividad de GSK-3 en el cerebro del ratón modelo de la EH.

Hasta muy recientemente, no había ninguna descripción del estado de GSK-3 en los pacientes de la EH. El análisis de p-GSK-3 se ve obstaculizado por la inestabilidad del epítipo y la variabilidad con el intervalo *post-mortem* (Li et al., 2005) y solamente se había explorado el nivel de GSK-3 total en la corteza y en el cerebelo de los pacientes pero no en el estriado, la parte del cerebro más afectada por la enfermedad (Lim et al., 2014). De acuerdo con esto, el análisis sistemático aquí reportado del nivel total de GSK-3 y los ensayos de actividad enzimática en cerebro anterior incluido en el estriado de los pacientes, nos permite afirmar que la actividad de GSK-3 está disminuida en el estriado *post-mortem* de los pacientes de EH.

En vista de lo descrito, las terapias relacionadas con GSK-3 para la EH, no deberían estar basadas en la inhibición de GSK-3 como inicialmente había sido asumido sino en incrementar la actividad de GSK-3. Partiendo del hecho de que no hay disponibles activadores directos de la enzima GSK-3, esta activación podría llevarse a cabo indirectamente mediante la inhibición de quinasas como AKT que fosforilan GSK-3 en su residuo serina N-terminal. De hecho, en la actualidad, los inhibidores de AKT están cerca de la clínica para el tratamiento del cáncer (Hong et al., 2014). De forma interesante, el fármaco *Celecoxib* que es un anti-inflamatorio no esteroideo, inicialmente desarrollado como un inhibidor selectivo de Cox-2, se sabe que también es capaz de inhibir a AKT y se cree que esto último puede contribuir a su efecto anticancerígeno (Yang et al., 2004). El *2,5-dimetil-celecoxib*, un derivado que no inhibe la Cox-2 ha mostrado ser terapéuticamente útil en cáncer y modelos de ratón de hipertrofia cardíaca gracias a su capacidad de inhibir AKT y por tanto, contribuyendo a una activación indirecta de GSK-3 (Takahashi-Yanaga, 2013).

Otro ángulo sobre las implicaciones terapéuticas de este trabajo, podrían ser la identificación del mecanismo que media entre la disminución de la actividad GSK-3 y el fenotipo asociado con la enfermedad. Como ha sido descrito, el ratón condicional dominante

negativo para GSK-3 desarrolla un incremento de la apoptosis neuronal y déficits motores mostrando un fenotipo muy parecido a la EH (Gomez-Sintes et al., 2007). Se sabe que esto es mediado por un incremento de la translocación al núcleo de factores NFATc3 y NFATc4 y como consecuencia incremento de la ruta de señalización FasL/Fas (Gomez-Sintes and Lucas, 2010, 2013). Tras nuestra observación de la reducción de GSK-3 en la EH, sería muy interesante analizar cómo está la ruta de señalización FasL/Fas en esta enfermedad para ver, si al igual que el ratón dominante negativo de GSK-3 está incrementado el nivel de FasL y por tanto, hubiera una sobre activación de esta ruta. De acuerdo con esto, la reducción de la señalización mediada por FasL podría ser un mecanismo para contrarrestar las dañinas consecuencias de la disminución de la actividad GSK-3 en la EH.

En resumen, aquí demostramos que los niveles de GSK-3 y la actividad, están disminuidos en el estriado de los pacientes de la EH así como en otras áreas cerebrales afectadas. Esto se recapitula en el modelo de la EH R6/1 y un incremento moderado de GSK-3 en cerebro anterior mediante manipulación genética resulta en la atenuación de los síntomas relacionados con la EH del ratón R6/1 demostrando así que la disminución de GSK-3 contribuye a la patogénesis de la EH. Esto evidencia la necesidad de mantener niveles fisiológicos de GSK-3 lo que ofrece una nueva vía para la intervención terapéutica basado en las oportunidades de incrementar la actividad de GSK-3 o atenuar los efectos secundarios de la disminución observada de GSK-3.

A continuación, tras los hallazgos anteriormente descritos sobre los niveles de actividad de GSK-3, nos propusimos estudiar uno de sus principales sustratos por su implicación en numerosas enfermedades neurodegenerativas, la proteína asociada a microtúbulos Tau. Nuestra primera sorpresa fue descubrir que en los ratones R6/1, parecía que había un incremento en su fosforilación en los epítomos sustrato de GSK-3. Esto nos pareció discordante, ya que al estar GSK-3 disminuida esperaríamos que hubiese una disminución en el nivel de fosforilación de Tau en los epítomos sustrato de éste. Esto hizo que centráramos la segunda parte del estudio en qué le ocurre a Tau en la EH.

La Enfermedad de Huntington es una tauopatía 4R con Tau nuclear rods.

En la siguiente parte del trabajo, mostramos como la mutación en la EH da lugar a alteraciones patogénicas de Tau, concretamente un incremento en el ratio 4R/3R de las

isoformas de Tau a favor de las isoformas Tau-4R y un incremento en el contenido de Tau total. Además, hemos descubierto la presencia de unos depósitos de Tau en formas de varilla que atraviesan el núcleo a los que hemos denominado TNRs en el cerebro de los pacientes de la EH y que también están presentes en el hipocampo de los pacientes de la EA. Finalmente, la atenuación del fenotipo motor del ratón transgénico de la EH con la reducción genética de Tau, demuestra un papel de Tau en la patogénesis de la EH. Pero todos estos hallazgos hacen que sea necesario más trabajo adicional para elucidar si los tres descubrimientos clave de este estudio, la alteración del *splicing* 4R/3R de Tau, la detección de los TNRs y, los efectos *in vivo* de la reducción de Tau en el ratón de la EH están ligados los unos a los otros.

Un importante punto que es necesario elucidar es la conexión entre el desbalance 4R/3R y los TNRs. Si se encontraran TNRs en los cerebros de los casos de pacientes con FTDP-17 con mutaciones intrónicas con el consabido desbalance 4R/3R (Hutton et al., 1998), esto sugeriría fuertemente que el desbalance 4R/3R es suficiente para causar TNRs. Para ello habría que explorar qué ocurre en las zonas cerebrales más afectadas por la enfermedad. En este momento no sabemos si los TNRs contribuyen a la patogénesis pero no sería de extrañar que una estructura que altera la forma del núcleo donde tienen lugar funciones muy importantes, alterara la dinámica de éste. Un posible mecanismo podría ser que el incremento en el ratio 4R/3R de las isoformas de Tau produjera una alteración en la dinámica de los microtúbulos. Éstos son estructuras dinámicas en continua polimerización y despolimerización para llevar a cabo sus funciones y, el incremento de la proporción de las isoformas de Tau con cuatro repeticiones o dominios de unión a microtúbulos haría que Tau se uniera de forma más estable y más estática a los microtúbulos y, por tanto, podrían tener lugar alteraciones intracelulares consecuentes como la alteración patogénica del transporte a lo largo de los axones acompañado por un crecimiento anormal de los microtúbulos desde el centrosoma que indujera una indentación nuclear con alto contenido en Tau. En ese caso, la formación de los TNRs podría no ser patogénica pero si un marcador de la alteración de la dinámica de los microtúbulos como consecuencia de una alteración del ratio 4R/3R. Por el contrario, los TNRs también podrían comprometer la integridad de la envuelta nuclear y/o dar lugar a la fragmentación nuclear y la muerte neuronal, por lo que el TNR estaría marcando la neurona que va a morir. Existen más posibilidades, que estos TNRs fueran un paso previo a la formación de los ovillos neurofibrilares que no se han detectado previamente porque los TNRs no están formados por Tau hiperfosforilado y los ovillos neurofibrilares sí o, que la neurona que está marcada con TNRs no desarrollará ovillos neurofibrilares. Muchas de éstas, son hipótesis que se pueden testar y, como se ha mencionado, serán necesarios experimentos adicionales para

explorar la interconexión y las implicaciones patofisiológicas de los hallazgos aquí reportados en el cerebro de los pacientes de la EH y los modelos.

Basándonos en esta hipótesis en que los TNRs fueran el resultado de un crecimiento anormal de los microtúbulos, cabría esperar la presencia en estos de componentes del citoesqueleto. En el año 2000, se describió la presencia de unas inclusiones intranucleares compuestas por tubulina en forma de varilla en el cerebro humano (Woulfe and Munoz, 2000). Seguidamente se vio que en una enfermedad variante de la FTD denominada Demencia de la enfermedad de las motoneuronas (DMND) se detectan éstas inclusiones intracitoplasmáticas que eran negativas para Tau y positivas para la ubiquitina (Woulfe et al., 2001) mientras que en la EA había una reducción de éstos en comparación con los individuos considerados control (Woulfe et al., 2002). También se describió la presencia de unas varillas similares a las que denominaron *rodlets de Roncoroni* positivos para tubulina y la isoforma α del receptor de glucocorticoide en neuronas dopaminérgicas de ratones tratados con MPTP (Lamba et al., 2005). Parece un poco extraño que estas estructuras y los TNRs fueran lo mismo ya que unos contienen Tau y otros no, pero sería necesario comprobarlo con dobles inmunofluorescencias. También han sido detectadas por el grupo de Ray Truant unas varillas nucleares que contienen la proteína cofilina que está implicada en regular el citoesqueleto de actina. En condiciones de estrés promueve la formación de dichas varillas compuestas por actina y cofilina en células *wild type* tratadas con 10% de DMSO y en el modelo celular de EH de células estriatales Q111 aparecen unas estructuras en forma de varilla que son positivas para Htt y al mismo tiempo para actina y cofilina y, células tratadas con 10% de DMSO también serían capaces de formar estas estructuras, lo que significaría que bajo condiciones de estrés la célula respondería formando estas varillas a modo de protección o marcando el daño (Munsie et al., 2011, Munsie et al., 2012).

Finalmente, este trabajo abre la posibilidad de que los TNRs o el desbalance 4R/3R puedan servir como biomarcadores de la EH. Sería necesario explorar si en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes somos capaces de detectar de forma diferencial las diferentes isoformas de Tau, aunque ya se sabe que por lo menos a nivel poblacional, hay un incremento del nivel de Tau total en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes de la EH (Constantinescu et al., 2011). Entre las muchas implicaciones de este trabajo, se requieren estudios futuros para determinar si se pueden encontrar las alteraciones de Tau en el resto de los desórdenes neurológicos causados por la expansión de las CAG. Si las alteraciones de Tau fueran específicas para la EH, esta podría ser la razón por la que, a diferencia de las SCAs, la EH

presenta alteraciones del movimiento asociadas al circuito de los ganglios basales y demencia cortical. Finalmente, la incidencia de los TNRs debe ser analizada detalladamente en la EA y en el resto de las tauopatías clásicas, particularmente en aquellas en las que la acumulación de Tau-4R y el desbalance de las isoformas 4R/3R como la FTDP-17.

En cuanto a las implicaciones terapéuticas de nuestros hallazgos de alteración de tau en la EH, nuestros resultados sugieren que la terapia génica o las terapias de Tau basadas y otras tauopatías en pequeñas moléculas actualmente bajo desarrollo para la FTDP y otras tauopatías (Brunden et al., 2009, Rodriguez-Martin et al., 2009) podrían ser útiles para la EH.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los cerebros *post-mortem* de pacientes de la Enfermedad de Huntington (EH) presentan disminución del nivel y de la actividad del enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) en las regiones más afectadas, el estriado, la corteza y el hipocampo.
2. Al igual que en los pacientes, en el ratón modelo de la EH R6/1 se produce una disminución del nivel y de la actividad de GSK-3, además de un incremento en su fosforilación inhibitoria en serinas en el estriado, la corteza y el hipocampo.
3. La disminución de GSK-3 contribuye a la patogénesis de la EH ya que hemos visto que la progresión de la enfermedad en los ratones R6/1 se atenúa mediante el incremento moderado de la actividad GSK-3 en el cerebro anterior de los ratones R6/1:LowTgGSK-3 que presentan mejora tanto de la atrofia cerebral como del fenotipo motor y cognitivo.
4. Los cerebros *post-mortem* de pacientes de la EH presentan un aumento del nivel de Tau total en corteza que también se observa en los ratones modelo.
5. En estriado y corteza de los pacientes de la EH hay un incremento del ratio 4R/3R de las isoformas de Tau a favor de las isoformas Tau-4R tanto a nivel de ARNm como de proteína y se observa una tendencia similar en los ratones modelo.
6. El factor SRSF6 que modula el *splicing* del exón 10 del gen de Tau (*MAPT*) se secuestra en las inclusiones de Htt mutada y presenta un incremento de su fosforilación en cerebros de pacientes y en ratones modelo de la EH.
7. Hemos detectado en los cerebros de pacientes de EH una nueva marca histopatológica de Tau en forma de varilla a lo largo del núcleo de las neuronas a la que hemos denominado Tau nuclear rods (TNRs). En la Enfermedad de Alzheimer también detectamos TNRs en el hipocampo de los pacientes de estadios muy tempranos.
8. La proteína Tau contribuye al fenotipo de EH del ratón R6/1 ya que una reducción genética de Tau en el mismo atenúa su fenotipo motor característico.
9. Las conclusiones anteriores, nos permiten afirmar que la EH es una tauopatía 4R con Tau nuclear rods (TNRs).

BIBLIOGRAFÍA

- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-271.
- Andrade MA, Bork P (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* 11:115-116.
- Andreadis A (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1739:91-103.
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31:10626-10633.
- Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Shikamoto Y, Tsuchiya K, Yagishita S, Beach T, Rogers J, Schwab C, McGeer PL (2001) Distinct isoforms of tau aggregated in neurons and glial cells in brains of patients with Pick's disease, corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 101:167-173.
- Arfeen M, Bharatam PV (2013) Design of glycogen synthase kinase-3 inhibitors: an overview on recent advancements. *Curr Pharm Des* 19:4755-4775.
- Arrasate M, Perez M, Avila J (2000) Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res* 25:43-50.
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:663-672.
- Bardai FH, D'Mello SR (2011) Selective toxicity by HDAC3 in neurons: regulation by Akt and GSK3beta. *J Neurosci* 31:1746-1751.
- Beaulieu JM, Marion S, Rodriguiz RM, Medvedev IO, Sotnikova TD, Ghisi V, Wetsel WC, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG (2008) A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell* 132:125-136.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, Caron MG (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5099-5104.
- Berger Z, Tfofi EK, Michel CH, Pasco MY, Tenant S, Rubinsztein DC, O'Kane CJ (2005) Lithium rescues toxicity of aggregate-prone proteins in *Drosophila* by perturbing Wnt pathway. *Hum Mol Genet* 14:3003-3011.
- Beurel E, Grieco SF, Jope RS (2014) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*.
- Beurel E, Jope RS (2006) The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 79:173-189.
- Bijur GN, De Sarno P, Jope RS (2000) Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem* 275:7583-7590.
- Bijur GN, Jope RS (2003) Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14:2415-2419.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101:1371-1378.
- Blum D, Herrera F, Francelle L, Mendes T, Basquin M, Obriot H, Demeyer D, Sergeant N, Gerhardt E, Brouillet E, Buee L, Outeiro TF (2014) Mutant huntingtin alters Tau phosphorylation and subcellular distribution. *Hum Mol Genet*.
- Bots GT, Bruyn GW (1981) Neuropathological changes of the nucleus accumbens in Huntington's chorea. *Acta Neuropathol* 55:21-22.
- Bowles KR, Brooks SP, Dunnett SB, Jones L (2012) Gene expression and behaviour in mouse models of HD. *Brain Res Bull* 88:276-284.
- Bowles KR, Jones L (2014) Kinase signalling in Huntington's disease. *J Huntingtons Dis* 3:89-123.

- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10:1089-1099.
- Brandt R, Leger J, Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131:1327-1340.
- Brion JP, Smith C, Couck AM, Gallo JM, Anderton BH (1993) Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 61:2071-2080.
- Brownlee J, Irving NG, Brion JP, Gibb BJ, Wagner U, Woodgett J, Miller CC (1997) Tau phosphorylation in transgenic mice expressing glycogen synthase kinase-3 β transgenes. *Neuroreport* 8:3251-3255.
- Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM (2009) Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature reviews* 8:783-793.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95-130.
- Cabodi S, Morello V, Masi A, Cicchi R, Broggio C, Distefano P, Brunelli E, Silengo L, Pavone F, Arcangeli A, Turco E, Tarone G, Moro L, Defilippi P (2009) Convergence of integrins and EGF receptor signaling via PI3K/Akt/FoxO pathway in early gene Egr-1 expression. *J Cell Physiol* 218:294-303.
- Carlier MF, Simon C, Cassoly R, Pradel LA (1984) Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie* 66:305-311.
- Carmichael J, Sugars KL, Bao YP, Rubinsztein DC (2002) Glycogen synthase kinase-3 β inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem* 277:33791-33798.
- Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F, Sipione S (2001) Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci* 24:182-188.
- Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M (2005) Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 6:919-930.
- Caviston JP, Holzbaur EL (2009) Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends Cell Biol* 19:147-155.
- Cleary JD, Ranum LP (2013) Repeat-associated non-ATG (RAN) translation in neurological disease. *Hum Mol Genet* 22:R45-51.
- Cohen P, Goedert M (2004) GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 3:479-487.
- Constantinescu R, Romer M, Zetterberg H, Rosengren L, Kiebert K (2011) Increased levels of total tau protein in the cerebrospinal fluid in Huntington's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 17:714-715.
- Chiu CT, Liu G, Leeds P, Chuang DM (2011) Combined treatment with the mood stabilizers lithium and valproate produces multiple beneficial effects in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Neuropsychopharmacology* 36:2406-2421.
- Chong ZZ, Li F, Maiese K (2005) Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. *Histol Histopathol* 20:299-315.
- Chow HM, Guo D, Zhou JC, Zhang GY, Li HF, Herrup K, Zhang J (2014) CDK5 activator protein p25 preferentially binds and activates GSK3 β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E4887-4895.
- Daughters RS, Tuttle DL, Gao W, Ikeda Y, Moseley ML, Ebner TJ, Swanson MS, Ranum LP (2009) RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. *PLoS Genet* 5:e1000600.
- Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 114:1179-1187.

- Diaz-Hernandez M, Hernandez F, Martin-Aparicio E, Gomez-Ramos P, Moran MA, Castano JG, Ferrer I, Avila J, Lucas JJ (2003) Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J Neurosci* 23:11653-11661.
- DiFiglia M, Sena-Esteves M, Chase K, Sapp E, Pfister E, Sass M, Yoder J, Reeves P, Pandey RK, Rajeev KG, Manoharan M, Sah DW, Zamore PD, Aronin N (2007) Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17204-17209.
- Doble BW, Woodgett JR (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116:1175-1186.
- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3:1141-1154.
- Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, et al. (1995) Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269:407-410.
- Eickholt BJ, Walsh FS, Doherty P (2002) An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *J Cell Biol* 157:211-217.
- Endo H, Nito C, Kamada H, Nishi T, Chan PH (2006) Activation of the Akt/GSK3 β signaling pathway mediates survival of vulnerable hippocampal neurons after transient global cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1479-1489.
- Engel T, Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F (2006a) Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3 β overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* 99:1445-1455.
- Engel T, Hernandez F, Avila J, Lucas JJ (2006b) Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* 26:5083-5090.
- Evert BO, Wullner U, Schulz JB, Weller M, Groscurth P, Trottier Y, Brice A, Klockgether T (1999) High level expression of expanded full-length ataxin-3 in vitro causes cell death and formation of intranuclear inclusions in neuronal cells. *Hum Mol Genet* 8:1169-1176.
- Fauquant C, Redeker V, Landrieu I, Wieruszeski JM, Verdegem D, Laprevote O, Lippens G, Gigant B, Knossow M (2011) Systematic identification of tubulin-interacting fragments of the microtubule-associated protein Tau leads to a highly efficient promoter of microtubule assembly. *J Biol Chem* 286:33358-33368.
- Ferrer I, Goutan E, Marin C, Rey MJ, Ribalta T (2000) Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res* 866:257-261.
- Forlenza OV, Diniz BS, Radanovic M, Santos FS, Talib LL, Gattaz WF (2011) Disease-modifying properties of long-term lithium treatment for amnesic mild cognitive impairment: randomised controlled trial. *Br J Psychiatry* 198:351-356.
- Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359:1-16.
- Fujino Y, Wang DS, Thomas N, Espinoza M, Davies P, Dickson DW (2005) Increased frequency of argyrophilic grain disease in Alzheimer disease with 4R tau-specific immunohistochemistry. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:209-214.
- Gines S, Ivanova E, Seong IS, Saura CA, MacDonald ME (2003) Enhanced Akt signaling is an early pro-survival response that reflects N-methyl-D-aspartate receptor activation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *J Biol Chem* 278:50514-50522.
- Giralt A, Friedman HC, Caneda-Ferron B, Urban N, Moreno E, Rubio N, Blanco J, Peterson A, Canals JM, Alberch J (2010) BDNF regulation under GFAP promoter provides engineered astrocytes as a new approach for long-term protection in Huntington's disease. *Gene Ther* 17:1294-1308.

- Godin JD, Colombo K, Molina-Calavita M, Keryer G, Zala D, Charrin BC, Dietrich P, Volvert ML, Guillemot F, Dragatsis I, Bellaïche Y, Saudou F, Nguyen L, Humbert S (2010) Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67:392-406.
- Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo J* 9:4225-4230.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Six J, Lubke U, Vandermeeren M, Cras P, Trojanowski JQ, Lee VM (1993) The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5066-5070.
- Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314:777-781.
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8:159-168.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989a) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519-526.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J* 8:393-399.
- Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4051-4055.
- Gomez-Sintes R, Hernandez F, Bortolozzi A, Artigas F, Avila J, Zaratin P, Gotteland JP, Lucas JJ (2007) Neuronal apoptosis and reversible motor deficit in dominant-negative GSK-3 conditional transgenic mice. *Embo J* 26:2743-2754.
- Gomez-Sintes R, Lucas JJ (2010) NFAT/Fas signaling mediates the neuronal apoptosis and motor side effects of GSK-3 inhibition in a mouse model of lithium therapy. *J Clin Invest* 120:2432-2445.
- Gomez-Sintes R, Lucas JJ (2013) Neuronal apoptosis and motor deficits in mice with genetic inhibition of GSK-3 are Fas-dependent. *PLoS One* 8:e70952.
- Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience* 61:765-772.
- Goode BL, Feinstein SC (1994) Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 124:769-782.
- Gotz J, Probst A, Spillantini MG, Schafer T, Jakes R, Burki K, Goedert M (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *Embo J* 14:1304-1313.
- Gould TD, Picchini AM, Einat H, Manji HK (2006) Targeting glycogen synthase kinase-3 in the CNS: implications for the development of new treatments for mood disorders. *Curr Drug Targets* 7:1399-1409.
- Grabowski PJ (1998) Splicing regulation in neurons: tinkering with cell-specific control. *Cell* 92:709-712.
- Gratuze M, Noel A, Julien C, Cisbani G, Milot-Rousseau P, Morin F, Dickler M, Goupil C, Bezeau F, Poitras I, Bissonnette S, Whittington RA, Hebert SS, Cicchetti F, Parker JA, Samadi P, Planel E (2014) Tau hyperphosphorylation and deregulation of calcineurin in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*.

- Graveley BR (2001) Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17:100-107.
- Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65:391-426.
- Grof P, Muller-Oerlinghausen B (2009) A critical appraisal of lithium's efficacy and effectiveness: the last 60 years. *Bipolar Disord* 11 Suppl 2:10-19.
- Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1994) Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* 33:9511-9522.
- Hall AC, Brennan A, Goold RG, Cleverley K, Lucas FR, Gordon-Weeks PR, Salinas PC (2002) Valproate regulates GSK-3-mediated axonal remodeling and synapsin I clustering in developing neurons. *Mol Cell Neurosci* 20:257-270.
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147:58-62.
- Hanger DP, Seereeram A, Noble W (2009) Mediators of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 9:1647-1666.
- Haq S, Michael A, Andreucci M, Bhattacharya K, Dotto P, Walters B, Woodgett J, Kilter H, Force T (2003) Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4610-4615.
- Hardt SE, Sadoshima J (2002) Glycogen synthase kinase-3 β : a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res* 90:1055-1063.
- Hardy J (2006) A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron* 52:3-13.
- Harjes P, Wanker EE (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 28:425-433.
- HDCRG (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72:971-983.
- He HJ, Wang XS, Pan R, Wang DL, Liu MN, He RQ (2009) The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biol* 10:81.
- Hernandez F, Avila J (2007) Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* 64:2219-2233.
- Hernandez F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ (2002) Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem* 83:1529-1533.
- Hernandez F, Lucas JJ, Avila J (2013) GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 33 Suppl 1:S141-144.
- Hill MM, Hemmings BA (2002) Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 93:243-251.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406:86-90.
- Hong DS, Henary H, Falchook GS, Naing A, Fu S, Moulder S, Wheler JJ, Tsimberidou A, Durand JB, Khan R, Yang P, Johansen M, Newman RA, Kurzrock R (2014) First-in-human study of pbi-05204, an oleander-derived inhibitor of akt, fgf-2, nf-kappaB and p70s6k, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 32:1204-1212.
- Hongisto V, Smeds N, Brecht S, Herdegen T, Courtney MJ, Coffey ET (2003) Lithium blocks the c-Jun stress response and protects neurons via its action on glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* 23:6027-6036.
- Hooper C, Killick R, Lovestone S (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104:1433-1439.
- Humbert S, Bryson EA, Cordelieres FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S, Greenberg ME, Saudou F (2002) The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* 2:831-837.

- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393:702-705.
- Hye A, Kerr F, Archer N, Foy C, Poppe M, Brown R, Hamilton G, Powell J, Anderton B, Lovestone S (2005) Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 373:1-4.
- Imahori K, Uchida T (1997) Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem* 121:179-188.
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wolfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Gotz J (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142:387-397.
- Jensen MA, Wilkinson JE, Krainer AR (2014) Splicing factor SRSF6 promotes hyperplasia of sensitized skin. *Nat Struct Mol Biol* 21:189-197.
- Jope RS (1999) Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Mol Psychiatry* 4:117-128.
- Jope RS, Roh MS (2006) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr Drug Targets* 7:1421-1434.
- Kassubek J, Juengling FD, Kioschies T, Henkel K, Karitzky J, Kramer B, Ecker D, Andrich J, Saft C, Kraus P, Aschoff AJ, Ludolph AC, Landwehrmeyer GB (2004) Topography of cerebral atrophy in early Huntington's disease: a voxel based morphometric MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:213-220.
- Khlistunova I, Biernat J, Wang Y, Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, Mandelkow E, Mandelkow EM (2006) Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem* 281:1205-1214.
- Klein PS, Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8455-8459.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2:1389-1397.
- La Spada AR, Taylor JP (2010) Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Rev Genet* 11:247-258.
- Lamba W, Prichett W, Munoz D, Park DS, Woulfe JM (2005) MPTP induces intranuclear rodlet formation in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res* 1066:86-91.
- Landles C, Sathasivam K, Weiss A, Woodman B, Moffitt H, Finkbeiner S, Sun B, Gafni J, Ellerby LM, Trottier Y, Richards WG, Osmand A, Paganetti P, Bates GP (2010) Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington disease. *J Biol Chem* 285:8808-8823.
- Lee G, Cowan N, Kirschner M (1988) The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239:285-288.
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001a) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24:1121-1159.
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001b) Neurodegenerative tauopathies. *Annual review of neuroscience* 24:1121-1159.
- Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP (2007) Increased level of active GSK-3 β in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:43-55.

- Li X, Bijur GN, Jope RS (2002) Glycogen synthase kinase-3 β , mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord* 4:137-144.
- Li X, Friedman AB, Roh MS, Jope RS (2005) Anesthesia and post-mortem interval profoundly influence the regulatory serine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 in mouse brain. *J Neurochem* 92:701-704.
- Li X, Liu M, Cai Z, Wang G (2010) Regulation of glycogen synthase kinase-3 during bipolar mania treatment. *Bipolar Disord* 12:741-752.
- Lievens JC, Iche M, Laval M, Faivre-Sarrailh C, Birman S (2008) AKT-sensitive or insensitive pathways of toxicity in glial cells and neurons in *Drosophila* models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 17:882-894.
- Lim NK, Hung LW, Pang TY, McLean CA, Liddell JR, Hilton JB, Li QX, White AR, Hannan AJ, Crouch PJ (2014) Localized changes to glycogen synthase kinase-3 and collapsin response mediator protein-2 in the Huntington's disease affected brain. *Hum Mol Genet* 23:4051-4063.
- Lin CY, Hsu YH, Lin MH, Yang TH, Chen HM, Chen YC, Hsiao HY, Chen CC, Chern Y, Chang C (2013) Neurovascular abnormalities in humans and mice with Huntington's disease. *Exp Neurol* 250:20-30.
- Liu F, Gong CX (2008) Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies. *Molecular neurodegeneration* 3:8.
- Lovestone S, Boada M, Dubois B, Hull M, Rinne JO, Huppertz H, Calero M, Andres MV, Gomez-Carrillo B, Leon T, Del Ser T (2014) A Phase II Trial of Tideglusib in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*.
- Lu J, Li T, He R, Bartlett PF, Gotz J (2014) Visualizing the microtubule-associated protein tau in the nucleus. *Sci China Life Sci* 57:422-431.
- Lucas FR, Goold RG, Gordon-Weeks PR, Salinas PC (1998) Inhibition of GSK-3 β leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *J Cell Sci* 111 (Pt 10):1351-1361.
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice. *Embo J* 20:27-39.
- Macdonald A, Briggs K, Poppe M, Higgins A, Velayudhan L, Lovestone S (2008) A feasibility and tolerability study of lithium in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 23:704-711.
- MacDonald JA, Storey KB (2007) The effect of hibernation on protein phosphatases from ground squirrel organs. *Arch Biochem Biophys* 468:234-243.
- Mailliot C, Bussiere T, Hamdane M, Sergeant N, Caillet ML, Delacourte A, Buee L (2000) Pathological tau phenotypes. The weight of mutations, polymorphisms, and differential neuronal vulnerabilities. *Ann N Y Acad Sci* 920:107-114.
- Mandelkow E, von Bergen M, Biernat J, Mandelkow EM (2007) Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 17:83-90.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Sellar M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87:493-506.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934.
- Manoukian AS, Woodgett JR (2002) Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways. *Adv Cancer Res* 84:203-229.
- Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER (1996) Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274:1678-1683.
- Meijer L, Flajolet M, Greengard P (2004) Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci* 25:471-480.

- Morfini G, Szebenyi G, Elluru R, Ratner N, Brady ST (2002) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *Embo J* 21:281-293.
- Moseley ML, Zu T, Ikeda Y, Gao W, Mosemiller AK, Daughters RS, Chen G, Weatherspoon MR, Clark HB, Ebner TJ, Day JW, Ranum LP (2006) Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat Genet* 38:758-769.
- Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β . *J Neurochem* 81:1073-1083.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Munsie L, Caron N, Atwal RS, Marsden I, Wild EJ, Bamburg JR, Tabrizi SJ, Truant R (2011) Mutant huntingtin causes defective actin remodeling during stress: defining a new role for transglutaminase 2 in neurodegenerative disease. *Hum Mol Genet* 20:1937-1951.
- Munsie LN, Desmond CR, Truant R (2012) Cofilin nuclear-cytoplasmic shuttling affects cofilin-actin rod formation during stress. *J Cell Sci* 125:3977-3988.
- Mykowska A, Sobczak K, Wojciechowska M, Kozłowski P, Krzyżosiak WJ (2011) CAG repeats mimic CUG repeats in the misregulation of alternative splicing. *Nucleic acids research* 39:8938-8951.
- Nalavade R, Griesche N, Ryan DP, Hildebrand S, Krauss S (2013) Mechanisms of RNA-induced toxicity in CAG repeat disorders. *Cell Death Dis* 4:e752.
- Nance MA, Myers RH (2001) Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7:153-157.
- Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81:811-823.
- Nelson DL, Orr HT, Warren ST (2013) The unstable repeats--three evolving faces of neurological disease. *Neuron* 77:825-843.
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387:271-280.
- Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6990-6995.
- Noshita N, Lewen A, Sugawara T, Chan PH (2001) Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1442-1450.
- O'Brien WT, Huang J, Buccafusca R, Garskof J, Valvezan AJ, Berry GT, Klein PS (2011) Glycogen synthase kinase-3 is essential for beta-arrestin-2 complex formation and lithium-sensitive behaviors in mice. *J Clin Invest* 121:3756-3762.
- Ortega Z, Lucas JJ (2014) Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. *Front Mol Neurosci* 7:77.
- Padilla R, Maccioni RB, Avila J (1990) Calmodulin binds to a tubulin binding site of the microtubule-associated protein tau. *Mol Cell Biochem* 97:35-41.
- Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5:731-736.
- Paoletti P, Vila I, Rife M, Lizcano JM, Alberch J, Gines S (2008) Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci* 28:10090-10101.

- Pap M, Cooper GM (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 273:19929-19932.
- Pap M, Cooper GM (2002) Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22:578-586.
- Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1997) Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:70-78.
- Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT (1994) Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5355-5358.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS (2003) GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423:435-439.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS (2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276:36734-36741.
- Pigino G, Morfini G, Pelsman A, Mattson MP, Brady ST, Busciglio J (2003) Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. *J Neurosci* 23:4499-4508.
- Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui DH, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A (2004) Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:2401-2411.
- Planel E, Richter KE, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, Krishnamurthy P, Herman M, Wang L, Schachter JB, Nelson RB, Lau LF, Duff KE (2007) Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* 27:3090-3097.
- Politis M, Pavese N, Tai YF, Tabrizi SJ, Barker RA, Piccini P (2008) Hypothalamic involvement in Huntington's disease: an in vivo PET study. *Brain* 131:2860-2869.
- Ranen NG, Stine OC, Abbott MH, Sherr M, Codori AM, Franz ML, Chao NI, Chung AS, Pleasant N, Callahan C, et al. (1995) Anticipation and instability of IT-15 (CAG) $_n$ repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am J Hum Genet* 57:593-602.
- Ranum LP, Cooper TA (2006) RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annual review of neuroscience* 29:259-277.
- Ravikumar B, Imarisio S, Sarkar S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC (2008) Rab5 modulates aggregation and toxicity of mutant huntingtin through macroautophagy in cell and fly models of Huntington disease. *J Cell Sci* 121:1649-1660.
- Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB (1988) Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5733-5737.
- Rigamonti D, Bauer JH, De-Fraja C, Conti L, Sipione S, Sciorati C, Clementi E, Hackam A, Hayden MR, Li Y, Cooper JK, Ross CA, Govoni S, Vincenz C, Cattaneo E (2000) Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* 20:3705-3713.
- Rodriguez-Martin T, Anthony K, Garcia-Blanco MA, Mansfield SG, Anderton BH, Gallo JM (2009) Correction of tau mis-splicing caused by FTDP-17 MAPT mutations by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Human molecular genetics* 18:3266-3273.
- Roos RA, Bots GT (1983) Nuclear membrane indentations in Huntington's chorea. *J Neurol Sci* 61:37-47.
- Rosenblatt A (2007) Understanding the psychiatric prodrome of Huntington disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:913.
- Ross CA (2002) Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* 35:819-822.

- Ross CA, Tabrizi SJ (2011) Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 10:83-98.
- Ruiz-Saenz A, van Haren J, Laura Sayas C, Rangel L, Demmers J, Millan J, Alonso MA, Galjart N, Correias I (2013) Protein 4.1R binds to CLASP2 and regulates dynamics, organization and attachment of microtubules to the cell cortex. *J Cell Sci* 126:4589-4601.
- Ruocco HH, Lopes-Cendes I, Laurito TL, Li LM, Cendes F (2006) Clinical presentation of juvenile Huntington disease. *Arq Neuropsiquiatr* 64:5-9.
- Saavedra A, Garcia-Martinez JM, Xifro X, Giralt A, Torres-Peraza JF, Canals JM, Diaz-Hernandez M, Lucas JJ, Alberch J, Perez-Navarro E (2010) PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 contributes to maintain the activation of the PI3K/Akt pro-survival pathway in Huntington's disease striatum. *Cell Death Differ* 17:324-335.
- Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC (2008) A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet* 17:170-178.
- Sathasivam K, Neueder A, Gipson TA, Landles C, Benjamin AC, Bondulich MK, Smith DL, Faull RL, Roos RA, Howland D, Detloff PJ, Housman DE, Bates GP (2013) Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:2366-2370.
- Scheuing L, Chiu CT, Liao HM, Linares GR, Chuang DM (2014) Preclinical and clinical investigations of mood stabilizers for Huntington's disease: what have we learned? *Int J Biol Sci* 10:1024-1038.
- Schilling G, Klevytska A, Tebbenkamp AT, Juenemann K, Cooper J, Gonzales V, Slunt H, Poirer M, Ross CA, Borchelt DR (2007) Characterization of huntingtin pathologic fragments in human Huntington disease, transgenic mice, and cell models. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:313-320.
- Shao J, Diamond MI (2007) Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2:R115-123.
- Shastri BS (2005) Bipolar disorder: an update. *Neurochem Int* 46:273-279.
- Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabiscol E (2008) Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med* 45:667-678.
- Squitieri F, Gellera C, Cannella M, Mariotti C, Cislighi G, Rubinsztein DC, Almqvist EW, Turner D, Bachoud-Levi AC, Simpson SA, Delatycki M, Maglione V, Hayden MR, Donato SD (2003) Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* 126:946-955.
- Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 6:1664-1668.
- Stambolic V, Woodgett JR (1994) Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J* 303 (Pt 3):701-704.
- Stieler JT, Bullmann T, Kohl F, Toien O, Bruckner MK, Hartig W, Barnes BM, Arendt T (2011) The physiological link between metabolic rate depression and tau phosphorylation in mammalian hibernation. *PLoS One* 6:e14530.
- Su P, Li S, Chen S, Lipina TV, Wang M, Lai TK, Lee FH, Zhang H, Zhai D, Ferguson SS, Nobrega JN, Wong AH, Roder JC, Fletcher PJ, Liu F (2014) A Dopamine D2 Receptor-DISC1 Protein Complex may Contribute to Antipsychotic-Like Effects. *Neuron* 84:1302-1316.
- Sun L, Zhao H, Xu Z, Liu Q, Liang Y, Wang L, Cai X, Zhang L, Hu L, Wang G, Zha X (2007) Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway stabilizes DNA methyltransferase I protein and maintains DNA methylation. *Cell Signal* 19:2255-2263.
- Takahashi-Yanaga F (2013) Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target. *Biochem Pharmacol* 86:191-199.

- Takahashi H, Egawa S, Piao YS, Hayashi S, Yamada M, Shimohata T, Oyanagi K, Tsuji S (2001) Neuronal nuclear alterations in dentatorubral-pallidoluysian atrophy: ultrastructural and morphometric studies of the cerebellar granule cells. *Brain Res* 919:12-19.
- Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B (1998) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 β and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9637-9641.
- Takuma H, Arawaka S, Mori H (2003) Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Brain Res Dev Brain Res* 142:121-127.
- Tobin AJ, Signer ER (2000) Huntington's disease: the challenge for cell biologists. *Trends Cell Biol* 10:531-536.
- Trojanowski JQ, Schuck T, Schmidt ML, Lee VM (1989) Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem* 37:209-215.
- Valencia A, Reeves PB, Sapp E, Li X, Alexander J, Kegel KB, Chase K, Aronin N, DiFiglia M (2010) Mutant huntingtin and glycogen synthase kinase 3- β accumulate in neuronal lipid rafts of a presymptomatic knock-in mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 88:179-190.
- Van Raamsdonk JM, Pearson J, Rogers DA, Bissada N, Vogl AW, Hayden MR, Leavitt BR (2005) Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 14:1379-1392.
- van Swieten JC (2007) Genetic basis of frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 6:840-841.
- Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ, Gross SP (2007) Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:87-92.
- Voisine C, Varma H, Walker N, Bates EA, Stockwell BR, Hart AC (2007) Identification of potential therapeutic drugs for huntington's disease using *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 2:e504.
- Vonsattel JP, DiFiglia M (1998) Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:369-384.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr. (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:559-577.
- Waldvogel HJ, Kim EH, Tippet LJ, Vonsattel JP, Faull RL (2014) The Neuropathology of Huntington's Disease. *Curr Top Behav Neurosci*.
- Watase K, Gatchel JR, Sun Y, Emamian E, Atkinson R, Richman R, Mizusawa H, Orr HT, Shaw C, Zoghbi HY (2007) Lithium therapy improves neurological function and hippocampal dendritic arborization in a spinocerebellar ataxia type 1 mouse model. *PLoS Med* 4:e182.
- Wei H, Qin ZH, Senatorov VV, Wei W, Wang Y, Qian Y, Chuang DM (2001) Lithium suppresses excitotoxicity-induced striatal lesions in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience* 106:603-612.
- Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, Libby RT, Satterfield TF, Lazarowski ER, Gilbert ML, Morton GJ, Bammler TK, Strand AD, Cui L, Beyer RP, Easley CN, Smith AC, Krainc D, Luquet S, Sweet IR, Schwartz MW, La Spada AR (2006) Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 α in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab* 4:349-362.
- White JK, Auerbach W, Duyao MP, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME (1997) Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat Genet* 17:404-410.
- Wood NI, Morton AJ (2003) Chronic lithium chloride treatment has variable effects on motor behaviour and survival of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Res Bull* 61:375-383.

- Woodgett JR (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J* 9:2431-2438.
- Woulfe J, Kertesz A, Munoz DG (2001) Frontotemporal dementia with ubiquitinated cytoplasmic and intranuclear inclusions. *Acta Neuropathol* 102:94-102.
- Woulfe J, Munoz D (2000) Tubulin immunoreactive neuronal intranuclear inclusions in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26:161-171.
- Woulfe JM, Hammond R, Richardson B, Sooriabalan D, Parks W, Rippstein P, Munoz DG (2002) Reduction of neuronal intranuclear rodlets immunoreactive for tubulin and glucocorticoid receptor in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 12:300-307.
- Xia J, Lee DH, Taylor J, Vandelft M, Truant R (2003) Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum Mol Genet* 12:1393-1403.
- Xifro X, Giralt A, Saavedra A, Garcia-Martinez JM, Diaz-Hernandez M, Lucas JJ, Alberch J, Perez-Navarro E (2009) Reduced calcineurin protein levels and activity in exon-1 mouse models of Huntington's disease: role in excitotoxicity. *Neurobiol Dis* 36:461-469.
- Xu W, Li Z, Yu B, He X, Shi J, Zhou R, Liu D, Wu Z (2013) Effects of DNMT1 and HDAC inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during porcine somatic cell nuclear transfer. *PLoS One* 8:e64705.
- Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101:57-66.
- Yang HM, Kim HS, Park KW, You HJ, Jeon SI, Youn SW, Kim SH, Oh BH, Lee MM, Park YB, Walsh K (2004) Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, reduces neointimal hyperplasia through inhibition of Akt signaling. *Circulation* 110:301-308.
- Yin X, Jin N, Gu J, Shi J, Zhou J, Gong CX, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Liu F (2012) Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A) modulates serine/arginine-rich protein 55 (SRp55)-promoted Tau exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 287:30497-30506.
- Yoshida H, Ihara Y (1993) Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: assembly incompetence of paired helical filament-tau. *J Neurochem* 61:1183-1186.
- Zander C, Takahashi J, El Hachimi KH, Fujigasaki H, Albanese V, Lebre AS, Stevanin G, Duyckaerts C, Brice A (2001) Similarities between spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) cell models and human brain: proteins recruited in inclusions and activation of caspase-3. *Hum Mol Genet* 10:2569-2579.
- Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein PS (2003) Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem* 278:33067-33077.
- Zhang S, Feany MB, Saraswati S, Littleton JT, Perrimon N (2009) Inactivation of *Drosophila* Huntingtin affects long-term adult functioning and the pathogenesis of a Huntington's disease model. *Dis Model Mech* 2:247-266.
- Zhukareva V, Joyce S, Schuck T, Van Deerlin V, Hurtig H, Albin R, Gilman S, Chin S, Miller B, Trojanowski JQ, Lee VM (2006) Unexpected abundance of pathological tau in progressive supranuclear palsy white matter. *Ann Neurol* 60:335-345.
- Zhukareva V, Mann D, Pickering-Brown S, Uryu K, Shuck T, Shah K, Grossman M, Miller BL, Hulette CM, Feinstein SC, Trojanowski JQ, Lee VM (2002) Sporadic Pick's disease: a tauopathy characterized by a spectrum of pathological tau isoforms in gray and white matter. *Ann Neurol* 51:730-739.
- Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD, Margolis J, Peterson M, Markowski TW, Ingram MA, Nan Z, Forster C, Low WC, Schoser B, Somia NV, Clark HB, Schmechel S, Bitterman PB, Gourdon G, Swanson MS, Moseley M, Ranum LP (2011) Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:260-265.
- Zuccato C, Cattaneo E (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81:294-330.

Zuccato C, Marullo M, Conforti P, MacDonald ME, Tartari M, Cattaneo E (2008) Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. *Brain Pathol* 18:225-238.

ANEXO

RELACIÓN DE PUBLICACIONES DE LA DOCTORANDA

Fernandez-Nogales M, Cabrera JR, Santos-Galindo M, Hoozemans JJ, Ferrer I, Rozemuller AJ, Hernandez F, Avila J, Lucas JJ. *Huntington's disease is a four-repeat tauopathy with tau nuclear rods*. **Nature Medicine**, 2014. **20**(8): p. 881-5.

Fernandez-Nogales M, Hernandez F, Miguez A, Alberch J, Ginés S, Pérez-Navarro E, Lucas JJ. *Decreased Glycogen Synthase Kinase-3 levels and activity contribute to Huntington's disease*
En revisión en Human Molecular Genetics.

